

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Patogénesis de la hiperprolactinemia urémica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Emilio Martín Oar

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

TP
1988
229



x - 53 - 044239 - 5

**PATOGENESIS DE LA HIPERPROLACTINEMIA
UREMICA**

José Emilio Martín Oar

Madrid, 1988

Colección Tesis Doctorales. N.º 229/88

© José Emilio Martín Oar

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 - 28015 Madrid
Madrid, 1988
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-7991-1988**

AUTOR: JOSE EMILIO MARTIN OAR.

PATOGENESIS DE LA HIPERPROLACTINEMIA UREMICA.

Director: José Miguel López Novoa.
Dr. en CC Biológicas
Jefe Adjunto del Servicio de Nefrología.
Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 - Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de CC Químicas

Departamento de Bioquímica

Año 1986

A mis Padres.

FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

CLÍNICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCIÓN

Avd Reyes Católicos 2 - Ciudad Universitaria

MADRID-28040

TELEFONO

2441600 - 244000

4491007 - 449111

D. José Miguel López Novoa, Doctor en Ciencias Biológicas,
Jefe Adjunto del Servicio de Nefrología de la Fundación
Jiménez Díaz,

CERTIFICA que D. José Emilio Martín Oar, ha realizado bajo
su dirección los experimentos necesarios para la
realización de su Tesis Doctoral, que lleva por
título : "PATOGENESIS DE LA HIPERPROLACTINEMIA
UREMICA".

Madrid, a 24 de Marzo de 1986.



Fdo.: J.M. López Novoa

D. Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica de la
Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense
de Madrid,

AVALA, como Ponente, la presente Tesis Doctoral.



Fdo.: Prof. Dr. A. Martín Municio

AGRADECIMIENTOS :

A José Miguel López Novoa ("Jotaeme"). Por su profesionalidad. En él he tenido el mejor ejemplo de abnegación, dedicación al trabajo y rigor científico. Además, ha sido un maestro paciente y un director entusiasta. Sin embargo, le agradezco aún más su amistad entera y sólida, fundamental en mi formación humana.

A D. Luis Hernando Avendaño. Por creer sin reservas en la investigación biomédica interdisciplinaria como base de una mejor medicina en general y Nefrología en particular. Por su excelente labor como director de equipo, tantas veces oculta o incomprendida, pero sustento esencial de los resultados obtenidos. Por último, y muy especialmente, por los privilegios de confianza y paciencia que me ha concedido.

Al Profesor D. Angel Martín Municio. Por su verdadero interés por dar la mejor formación a sus alumnos, incluso después de graduados. De forma especial quiero agradecerle su interés por el presente trabajo, así como sus comentarios sobre el mismo.

A Santos Casado, Ramón Peces, Blanca Ramos, Mariví Cachofeiro, Dina del Pino, y Diego Rodríguez Puyol, amigos y colaboradores insustituibles. Por su ilusión y trabajo excepcionales.

Al conjunto de profesionales, médicos, enfermeras y técnicos de laboratorio, que constituyen el equipo clínico del Servicio de Nefrología de la F.J.D.. Por facilitar la selección de pacientes, la recogida de muestras y la analítica clínica para el estudio realizado en humanos.

A las personas, controles y pacientes, que se ofrecieron como sujetos de experimentación, por su colaboración entusiasta.

A Rosa Vidania y Francisco Mingod. Por su colaboración inestimable en el tratamiento matemático de parte de los resultados.

- V -

A todos los compañeros que durante estos años han formado parte del equipo investigador del Servicio de Nefrología de la F.J.D., por su colaboración, amistad y estímulo.

A mis compañeros del grupo de empresas I. Llorente-Fides. Por su amistad, apoyo y comprensión. De forma muy singular, quiero agradecer a Pedro Ortiz su interés por el éxito de este esfuerzo.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a las distintas Instituciones que con su soporte económico han hecho posible la realización de este trabajo :

- Fundación Jiménez Díaz
- Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz
- Fundación Iñigo Alvarez de Toledo
- Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social
- Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica
- Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid.

ABREVIATURAS UTILIZADAS.-

ABREVIATURAS

AMPT: α -metil-p-tirosina.
AO: Autoinfusión de orina. Modelo de uremia aguda.
Asn: Asparagina.
Asp: Acido aspártico.
b: Pendiente de la recta semilogarítmica de disminución de la prolactinemia tras un estímulo agudo con TRH.
BA: Bioensayo.
 β - END: β - Endorfina.
BSA: Albúmina sérica bovina.
C: Control(es).
 C_{cr} : Aclaramiento de creatinina endógena, cuyo valor se considera una medida válida de la tasa de filtración glomerular.
hCG: Gonadotropina Coriónica humana.
cpm: Cuentas por minuto.
Cys: Cisteína.
DA: Dopamina.
DE: Desviación estandar.
cdNA: Acido desoxiribonucleico (DNA) complementario.
EDTA: Acido etilén-diamino-tetraacético.
EEM, eem: Error estandar de la media.
FSH: Hormona estimulante de los folículos.
GH: Hormona del crecimiento.
GnRH: Hormona liberadora de Gonadotropinas.
HDP: Hemodiálisis periódica. Enfermos que reciben esta terapia.
ID: Indice de desaparición (Resultados, apartado II.5.2; Discusión, apartado II.1)
IRC: Insuficiencia renal crónica. Enfermos en esta situación.
iv: Intravenoso.
 K_{av} : Coeficiente de reparto en una cromatografía de penetrabilidad molecular (Material y Métodos, apartado I.2.3).
LBU: Ligadura bilateral de uréteres. Modelo de uremia aguda.
LH: Hormona luteinizante o luteotropa.
Ln, ln: Logaritmo neperiano.
MCR: Tasa de aclaramiento metabólico.
 Na^+ , K^+ -ATPasa: Sodio, potasio-Adenosintrifosfatasa.

- VIII -

Nb₂-BA: Bioensayo para PRL desarrollado por Tanada y Col. (1980)
(Introducción, apartado V.4.1.).

NBx: Nefrectomía bilateral. Modelo de uremia aguda.

NIAMDD: National Institute of Arthritis, Metabolism and
Digestive Diseases.

NIH: National Institute of Health.

Ø: Diámetro.

O.M.S.: Organización Mundial de la Salud.

OVX: Ovariectomía.

p: Probabilidad de significación estadística.

PGF_{2α} : Prostaglandina F_{2α} .

PIF(s): Factor(es) inhibidor(es) de la secreción de PRL.

hPL: Lactógeno placentario humano.

PR: Tasa de secreción.

PRF(s): Factor(es) liberador(es) de la PRL.

PRL(s): Prolactina(s):

bPRL: PRL bovina.

G-PRL: PRL glicosilada.

hPRL: PRL humana.

hPRL₀: Niveles circulantes de hPRL en condiciones basa-
les.

hPRL₂₀: Niveles circulantes de hPRL a los 20 minutos de
un bolo iv de TRH.

hPRL₁₂₀: Niveles circulantes de hPRL a los 120 minutos
de un bolo iv de TRH.

mPRL: PRL murina.

pre-PRL: preprolactina.

oPRL: PRL ovina.

rPRL: PRL de rata.

R,r: Coeficiente de correlación.

RIA: Radioinmunoensayo.

RP-1: Primer estandar de referencia de rPRL preparado por el
NIAMDD.

RP-2: Segundo estandar de referencia de rPRL preparado por el
NIAMDD.

rpm: revoluciones por minuto.

RRA: Radioreceptorensayo.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico.

T: Transplantado(s). Enfermos que han recibido un injerto renal funcionando.

TRH: Factor liberador de la hormona TSH.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

\bar{X}, \bar{x} : Media.

Δ_{0-20} : Incremento neto en los niveles circulantes de hPRL entre la situación basal y 20 minutos después de un bolo iv de TRH.

Δ_{20-120} : Decremento neto de los niveles circulantes de hPRL entre los 20 y 120 minutos después de un bolo iv de TRH.

INTRODUCCION

1.- FUNCIONES BIOLOGICAS DE LA PROLACTINA (PRL).

1.1.- Papel de la PRL en el desarrollo y función de la glándula mamaria.

1.1.1.- Mamogénesis.

1.1.2.- Lactogénesis.

1.2.- Papel de la PRL en la regulación de la función gonadal.

1.2.1.- Regulación de la función ovárica.

1.2.2.- Regulación de la función testicular.

1.2.3.- Regulación de la secreción de LH.

2.- REGULACION DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE PRL.

2.1.- Regulación de la secreción de PRL.

2.1.1.- Dopamina.

2.1.2.- GAP.

2.1.3.- TRH.

2.1.4.- Serotonina.

2.1.5.- Estrógenos.

2.1.6.- Prolactina.

2.2.- Catabolismo de la PRL.

2.2.1.- aclaramiento renal de péptidos y proteínas de bajo peso molecular.

3.- FISIOPATOLOGIA DE LA HIPERPROLACTINEMIA.

3.1.- Alteraciones de la función gonadal femenina.

3.2.- Alteraciones de la función gonadal masculina.

3.3.- Hipogonadotrofismo.

3.4.- Alteraciones de la conducta sexual.

4.- HIPERPROLACTINEMIA UREMICA.

4.1.- Síndrome urémico.

4.2.- Hipogonadismo urémico.

4.2.1.- El eje hipotálamo-hipófisis-gónada en la uremia.

4.2.2.- Hiperprolactinemia urémica e hipogonadismo.

4.2.3.- Patogénesis de la hiperprolactinemia urémica.

5.- ESTRUCTURA DE LA PRL.

5.1.- PRL nativa.

5.2.- Polimorfismo de la PRL.

5.2.1.- Formas de PRL con diferente tamaño molecular.

- 5.2.2.- Variantes de carga de la PRL.
- 5.2.3.- PRL abierta.
- 5.2.4.- Formas glicosiladas de PRL.
- 5.3.- Relación entre las distintas variantes de PRL descritas.
 - 5.3.1.- PRL pequeña.
 - 5.3.2.- PRL grande.
 - 5.3.3.- PRL grande-grande.
- 5.4.- Actividad biológica de las distintas variantes de PRL.
 - 5.4.1.- Bioensayos de PRL.
 - 5.4.2.- Valoración de la actividad biológica de la PRL total.
 - 5.4.3.- Actividad biológica de las PRLs pequeña, grande y grande-grande.
 - 5.4.4.- Actividad biológica de las variantes de carga de la PRL.
 - 5.4.5.- Actividad biológica de la PRL abierta.

OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS

- 1.- ESTUDIOS EN RATAS.
 - 1.1.- Animales de experimentación.
 - 1.1.1.- Modelos experimentales.
 - 1.1.2.- Controles.
 - 1.1.3.- Comprobación de la efectividad de los modelos.
 - 1.1.4.- Manipulación general de los animales.
 - 1.1.5.- Estudio de la posible influencia de la orina autoinfundida sobre la rPRL inmunorreactiva circulante.
 - 1.2.- Cromatografía de penetrabilidad molecular.
 - 1.2.1.- Calibrado de columnas.
 - 1.2.2.- Preparación de marcadores.
 - 1.2.3.- Expresión de los resultados cromatográficos.
 - 1.3.- Determinación de la rPRL.
 - 1.3.1.- Preparación del trazador.
 - 1.3.2.- Preparación de un suero de carnero anti-IgG de conejo.

- 1.3.3.- Estándares.
- 1.3.4.- Procedimiento analítico.
- 1.3.5.- Sensibilidad del análisis.
- 1.3.6.- Fiabilidad.
- 1.4.- Determinación de la creatinina plasmática.
- 2.- ESTUDIO EN HUMANOS.
 - 2.1.- Selección de individuos.
 - 2.2.- Prueba de estímulo de secreción de hPRL por TRH.
 - 2.3.- Estudio emparejado pre/post-transplante renal.
 - 2.4.- Cromatografía de penetrabilidad molecular.
 - 2.5.- Determinación de la hPRL
 - 2.5.1.- Procedimiento analítico.
 - 2.5.2.- Sensibilidad del análisis.
 - 2.5.3.- Fiabilidad.
 - 2.5.4.- Análisis de resultados cromatográficos.
 - 2.6.- Determinación del aclaramiento de creatinina.
- 3.- COMPARACION DE RESULTADOS.

RESULTADOS

- 1.- ESTUDIOS EN RATAS.
 - 1.1.- Niveles basales de rPRL en distintos modelos de uremia aguda en ratas.
 - 1.2.- Influencia de la orina de rata AO sobre la rPRL plasmática
 - 1.3.- Distribución de la rPRL inmunorreactiva circulante en una cromatología de exclusión molecular en sephadex G-100, en distintos modelos de uremia aguda en ratas.
 - 1.3.1.- Perfiles de elución.
 - 1.3.2.- Distribución cuantitativa.
- 2.- ESTUDIOS EN HUMANOS:
 - Análisis de la distribución de la hPRL inmunorreactiva circulante en una cromatografía de exclusión molecular en sephadex G-100, en distintos grupos de enfermos urémicos.
 - 2.1.- Perfiles de elución.
 - 2.2.- Distribución en condiciones basales.

- 2.3.- Distribución a los 20 minutos del estímulo agudo con TRH.
- 2.4.- Distribución a los 120 minutos del estímulo agudo con TRH.
- 2.5.- Análisis de la respuesta al estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.1.- Análisis de las variaciones en la prolactinemia entre la situación basal y los 20 minutos tras el estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.2.- Análisis de las variaciones en la prolactinemia entre los 20 y 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.3.- Relación del ID con el grado de función renal.
- 2.6.- Estudio emparejado pre/pos-trasplante renal de la prolactinemia basal.

DISCUSION

- 1.- HIPERPROLACTINEMIA EN LA UREMIA AGUDA EXPERIMENTAL.
 - 1.1.- Modelos de Uremia aguda.
 - 1.2.- Prolactinemia basal en los distintos modelos de uremia aguda en ratas.
 - 1.3.- Heterogeneidad de la prolactina circulante en la uremia aguda en ratas.
 - 1.3.1.- Distribución de la rPRL circulante en sephadex G-100.
 - 1.3.2.- Valores cuantitativos, comparación de los modelos de uremia.
 - 1.4.- Patogénesis de la hiperprolactinemia de la uremia aguda en ratas.
- 2.- HIPERPROLACTINEMIA EN LA UREMIA CRONICA HUMANA.
 - 2.1.- Definición de "Índice de Desaparición" (ID) en una prueba de estimulación aguda de la secreción de hPRL por TRH.
 - 2.1.1.- Mecanismos implicados en la regulación de la respuesta a un estímulo de secreción de PRL por TRH.
 - 2.1.2.- Significado del ID.
 - 2.2.- Grupos de enfermos.

- 2.3.- Prolactinemia basal.
- 2.4.- Prueba de estímulo de secreción con TRH.
 - 2.4.1.- Relación del ID con la tasa de filtración glomerular.
- 2.5.- Heterogeneidad en sephadex G-100 de la hPRL circulante en la uremia crónica humana.
 - 2.5.1.- Heterogeneidad de la hPRL circulante en individuos controles.
 - 2.5.1.1.- Distribución de la hPRL circulante 20 minutos después del estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.1.2.- Distribución de la hPRL circulante 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.2.- Heterogeneidad de la hPRL circulante en los grupos urémicos.
 - 2.5.2.1.- Distribución de la hPRL circulante 20 minutos después del estímulo agudo con TRH.
 - 2.5.2.2.- Distribución de la hPRL circulante 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.
- 2.6.- Comentarios generales al estudio en humanos.
- 3.- PATOGENESIS DE LA HIPERPROLACTINEMIA UREMICA.
 - 3.1.- Valoración de las pruebas de estímulo y supresión de la secreción de prolactina.
 - 3.2.- Valoración del método de cálculo de la tasa de secreción de prolactina.
 - 3.3.- La disminución o ausencia de la función de filtración glomerular, causa de la hiperprolactinemia urémica.
- 4.- HIPOGONADISMO UREMICO E HIPERPROLACTINEMIA.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

1.- FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROLACTINA.-

La PRL es una hormona muy antigua en la escala filogenética. Desde los peces a los mamíferos, esta hormona ha cumplido muy diversas funciones, habiéndose descrito más de cien, aunque probablemente ni todas ellas sean ciertas ni todas tengan importancia fisiológica (Nicoll 1980; Bern 1982).

En los mamíferos, la PRL juega un papel muy importante en el proceso reproductor, fundamentalmente a dos niveles:

- a) Como hormona mamogénica y lactogénica.
 - b) Como factor regulador de la función gonadal, en ambos sexos.
- En otras especies inferiores, la PRL tiene funciones específicas sobre el crecimiento y la metamorfosis, y sobre el balance hidroelectrolítico. En realidad, vestigios de estas funciones se conservan en los mamíferos, incluido el hombre, siendo interesante destacar el papel de la PRL en el desarrollo fetal y en los cambios fisiológicos asociados a la pubertad.

Hasta 1970/1972 no quedó claramente demostrada la existencia de la prolactina como hormona independiente en el hombre (Frantz y Kleinberg 1970; Hwang y Col 1971; Sherwood 1971), ya que en esta especie y en primates superiores la hormona del crecimiento (GH) tiene actividad lactogénica intrínseca, a la vez que sus propiedades físico-químicas son similares a las de la PRL a pesar de que su homología en estructura primaria es sólo de un 16% (Shome y Parlow 1977).

1.1.- Papel de la PRL en el desarrollo y función de la glándula mamaria.-

(Topper y Freeman 1980; Delouis y Col. 1982; Schams y Col. 1984; Kleinberg y Col 1985).

1.1.1.- Mamogénesis.-

La glándula mamaria comienza su primera fase de desa-

rollo en la pubertad, inducida por los estrógenos que estimulan el crecimiento del estroma y del sistema de conductos, así como el depósito de grasa. Sin embargo un desarrollo completo del tejido glandular sólo tiene lugar durante la segunda mitad de la gestación, haciéndose funcional en el parto. Con el destete la glándula mamaria vuelve a su estado pre-gestacional.

El desarrollo completo de la estructura lobulo-alveolar tiene lugar bajo el control secuencial de hormonas hipofisarias (PRL y GH), ováricas y fetoplacentarias (estrógenos, progesterona y lactógeno placentario), y adrenales (gluco-corticoides). De todas ellas, son la PRL y los estrógenos las que juegan el papel principal al iniciar la multiplicación celular del epitelio matriz.

La PRL parece ser la responsable de la iniciación de la actividad mitótica de las células epiteliales mamarias que conducirá a la estructura alveolar, aunque para que esta acción tenga lugar es necesaria la acción permisiva previa del 17 -estadiol y la progesterona. Sin embargo, una vez iniciada, no es necesaria una nueva señal estro-progestática para mantener el "permiso" a la acción mitótica de la PRL.

1.1.2.- Lactogénesis.-

De forma sucesiva y proporcional a la aparición de los alveolos mamarios durante la gestación, las células epiteliales que los forman van adquiriendo la capacidad de sintetizar los elementos constituyentes de la leche. Sin embargo esta actividad sintética específica carece de importancia hasta el momento del parto. Como consecuencia de la caída brusca de los estrógenos y la progesterona circulantes al ser expulsada la placenta. Los estrógenos, que en una acción sinérgica con la PRL promocionan el crecimiento mamario y su diferenciación, antagonizan simultáneamente el efecto de esta misma hormona inhibiendo la secreción lactea. La progesterona a su vez ejerce una acción inhibitoria sobre la acción lactogénica de la PRL.

La PRL es la única hormona esencial para la lactogénesis si bien su acción está modulada por otras hormonas como los corticoides, la GH, las hormonas tiroideas y las prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$), con variantes según las especies. Iniciada la lactación, la propia acción de mamar mantiene los niveles plasmáticos de PRL muy elevados, garantizando el mantenimiento de la estructura alveolar y la lactogénesis hasta el destete.

Entre las funciones lactogénicas mediadas directamente por la PRL, cabe destacar las siguientes:

- a) La síntesis de caseínas y α -lactoalbúmina (subunidad reguladora del complejo enzimático lactosa sintetasa, y a su vez una de las principales proteínas de la leche; Servely y Col. 1982)
- b) La activación del sistema enzimático γ -glutamyl transferasa responsable directo de la captación de aminoácidos para la síntesis de las proteínas lácteas (Pocius y Col. 1980); Viña y Col. 1981).
- c) La síntesis de ácidos grasos de cadena corta característicos de la leche, así como la captación de ácidos grasos procedentes de la dieta (quilomicrones) para la síntesis de triglicéridos lácteos (Zinder y Col, 1974).
- d) La regulación de una Na^+ , K^+ -ATPasa, ouabaina sensible, responsable del mantenimiento de las concentraciones de electrolitos lácteos (Shiu y Friesen 1980; Bisbee 1981).
- e) La "fijación" de linfoblastos-IgA al epitelio mamario, donde la IgA producida es transportada a la leche (Weisz-Carrington y Col. 1978).

1.2.- Papel de la PRL en la regulación de la función gonadal.-

Las acciones de la PRL sobre la función gonadal, tanto masculina como femenina, se realizan a dos niveles: a nivel go-

nadal propiamente dicho, y a nivel hipofisario, modulando la secreción de hormona luteizante (LH). En el caso del sexo masculino, la PRL juega además un papel muy importante en el desarrollo de las glándulas sexuales accesorias actuando en sinergismo con los andrógenos o potenciando su efecto al activar la formación de metabolitos activos (Bartke 1980, Keenan y Col 1981; Barañao y Col. 1981; Ohlson y Col. 1981).

1.2.1.- Regulación de la función ovárica.-

La PRL parece desempeñar un papel importante en el desarrollo ovárico que conduce a la pubertad. En la rata, el efecto de la PRL se traduce, al menos en parte, en el aumento del número de receptores de LH del ovario (Advis y Col. 1981 y 1982; González y Col. 1984).

Durante la fase folicular del ciclo ovárico, niveles circulantes de PRL equivalentes a los que se observan durante el ciclo menstrual normal, son esenciales para mantener la secreción de progesterona estimulada por la LH, en las células granulosas de los folículos maduros. Por el contrario, niveles elevados de PRL, del orden de los observados durante la lactación, interfieren la acción de la LH sobre la progesterona y de la FSH (Hormona estimulante del folículo) sobre los estrógenos, evitando el desarrollo completo de los folículos, e induciendo por tanto a un estado anovulatorio (Dorrington y Gore-Langton 1982; Wang y Chan 1982; Ben-David y Schenker 1982; Magoffin y Erickson 1982; Boehm y Col. 1982). Estos hechos han venido a explicar el hecho conocido desde antiguo de la infertilidad puerperal, y a corroborar su dependencia de la PRL (Bohnet y McNeilly 1979).

Durante la fase luteal del ciclo ovárico, en las distintas especies estudiadas, la PRL es necesaria junto con la LH para la formación del cuerpo luteo. Sin embargo, una vez formado, éste parece funcionar de forma autónoma, pudiendo secretar progesterona en ausencia de estímulo luteotrópico. Así mismo, durante el comienzo de la gestación la PRL es indispensable para

el mantenimiento y transformación del cuerpo luteo, induciendo y manteniendo los receptores de LH, y por tanto la secreción de progesterona (Smith 1980; Hamada y Col. 1980; Day y Col. 1980; Harris y Murphy 1981).

1.2.2.- Regulación de la función testicular.-

La PRL, a nivel testicular, actúa fundamentalmente a tres niveles: Sobre el propio crecimiento testicular, sobre la síntesis y secreción de la testosterona y sobre la espermatogénesis. Se ha demostrado la presencia de receptores específicos en diversos animales, pero no en el hombre, a pesar de la evidencia de su acción. (Bartke 1980; Ohlson y Col. 1981; Nag y Col. 1981; Wahlström y Col. 1983).

La PRL estimula la síntesis y secreción de testosterona en las células de Leydig. Esta acción la realiza tanto directamente, potenciando la esteroidogénesis (Murrabi y Col. 1985) como modulando la respuesta a la LH mediante la regulación de sus receptores (Bartke 1980; Murrabi y Col. 1985; Tresguerres y Col. 1985).

La PRL, al menos en la rata, está implicada en el proceso de transformación del espermatocito en espermátida (Nag y Col. 1981). A nivel de espermatozoide, la PRL activa la glicólisis y la utilización de fructosa (Sheth y Col. 1979).

1.2.3.- Regulación de la secreción de LH.-

En las diferentes especies estudiadas, la PRL parece estar implicada en el control hipofisario de las funciones reproductoras (Bohnet y McNeilly 1979; Bartke 1980; Tresguerres y Col. 1981; Tresguerres y Esquifino 1981; Esquifino y Col. 1984; Tresguerres y Col. 1985).

La PRL parece tener un efecto supresor sobre la LH, tanto a nivel de su secreción como de su síntesis. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por una supresión de la

respuesta hipofisaria a la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), posiblemente mediada por la dopamina (Esquifino y Col. 1984). La supresión de la PRL sobre la LH es especialmente evidente en los casos de hiperprolactinemias no fisiológicas. En el caso de la inhibición de la LH asociada a la lactancia, además del efecto de la PRL, también están implicados estímulos inducidos por la succión mamaria (Judd y Col. 1978; Smith 1980).

2.- REGULACION DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE PROLACTINA.-

Los niveles circulantes de PRL, como los de cualquier otra hormona, dependen del equilibrio entre su secreción y su aclaramiento metabólico.

2.1.- Regulación de la secreción de PRL.-

(Kruglich 1979; Ferland y Col. 1980; Clemens y Col. 1980; Clemens y Shaar 1980; Leong y Col. 1983; Müller y Col. 1983; Raymond y Porter 1985).

La PRL es la única hormona hipofisaria cuyo control tónico hipotalámico es fundamentalmente inhibitorio. Aunque se han propuesto diferentes factores inhibidores de la secreción de PRL (PIFs) es evidente que la dopamina (DA) es el regulador fisiológico más importante de la prolactinemia. Entre otros posibles PIF propuestos cabe destacar la acetil-colina y la histamina (actuando a nivel de receptores H_2). También se ha propuesto la existencia de un PIF polipeptídico, en este sentido acaba de ser descrita la existencia de un péptido asociado a GnRH (GAP) con una potente actividad inhibidora de la secreción de PRL (Nikolics y Col. 1985).

Por otra parte, el hipotálamo también ejerce un control positivo sobre la secreción de PRL que es fundamental en determinadas situaciones fisiológicas como la lactación. Como en el caso del PIF, se han propuesto distintos factores liberadores

de la PRL (PRFs) entre los que cabe destacar la TRH (hormona liberadora de la hormona tirotrópica -TSH-), la serotonina, el VIP (péptido intestinal vasoactivo), los opiáceos endógenos, y la histamina (actuando a nivel de receptores H_1). También en este caso se ha postulado un PRF polipéptido de estructura indeterminada. De todos estos posibles PRFs, parece que pueden jugar un papel fisiológico importante la TRH y la serotonina.

Por último, la secreción de PRL está modulada por diferentes hormonas, entre las que cabe destacar por su importante papel fisiológico los estrógenos y la propia PRL, capaz de autorregular su secreción.

2.1.1.- Dopamina.

Si bien algunos datos hacen pensar que la DA no da cuenta de la totalidad de la actividad PIF, su papel fundamental en la regulación tónica de la prolactinemia basal está fuera de toda duda (Krulich 1979; Quigley y Col. 1.980; Ferland y Col. 1980; Clemens y Shaar 1980; Clemens y Col. 1980; Leong y Col. 1983; Müller y Col. 1983; Raymond y Porter 1985).

La DA es secretada por las neuronas del sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, cuyo cuerpo celular está localizado en el hipotálamo medio-basal, proyectando sus axones hacia la capa externa de la eminencia media y terminando en las proximidades del plexo capilar del sistema vascular portal hipotálamo-adenohipofisario (Moore y Col. 1980).

La DA actúa sobre el lactotrofo a través de su unión a receptores específicos (Goldsmith y Col. 1979), siendo internada y asociándose a los gránulos secretorios de PRL (Gudelsky y Col. 1980). Además de un control sobre la secreción, la DA parece ejercer una acción reguladora de los niveles intracelulares de prolactina, inhibiendo su síntesis a nivel pretraduccional (Maurer 1981; Brocas y Col. 1981), y estimulando la degradación interna de la hormona (crinofagia; Shenai y Wallis 1979; Dannies

y Rudnick 1980). Por otra parte la DA también parece estar implicada en el control (inhibitorio) del crecimiento y multiplicación de los lactotrofos, habiéndose relacionado la reducción crónica del tono dopaminérgico tuberoinfundibular con la aparición de procesos tumorales hipofisarios(Ferrari y Col. 1983; Sarkar y Col. 1984), mientras que los dopaminoagonistas tienen una acción antiproliferativa sobre los prolactinomas, además de suprimir la secreción de PRL (Müller y Col. 1983).

2.1.2.- GAP.-

Se trata de un péptido de 56 aminoácidos incluido en las posiciones 14-69 del precursor de la GnRH (decapéptido N-terminal de la prohormona). La estructura primaria de éste precursor (unos 10000 Da) ha sido deducida a partir de un cDNA derivado de mRNAs placentarios e hipotalámicos tanto humanos como de rata (Seeburg y Adelman 1984; Adelman y Col., en prensa, citado por Nikolics y Col 1985). A partir de este cDNA se ha construido un vector de expresión para la síntesis bacteriana del GAP. Este GAP obtenido mediante la tecnología del DNA recombinante ha demostrado ser un potente inhibidor de la secreción de PRL, al tiempo que estimula la liberación de gonadotropinas (especialmente FSH) en cultivos de células hipofisarias de rata (Nikolics y Col. 1985). Así mismo, Phillips y Col. (1985) han obtenido un antisuero contra el péptido sintético correspondiente a los residuos 40-53 del precursor de GnRH, demostrando por técnicas inmunocitoquímicas la coexistencia del GAP con la GnRH en los gránulos secretorios de los terminales nerviosos de la eminencia media, sugiriendo su cosecreción.

El descubrimiento del GAP es importante y atractivo pues podría proporcionar una explicación sencilla de la relación inversa entre secreción de PRL y de gonadotropinas. Así mismo podría explicar en parte la disociación que tiene lugar entre la liberación de LH y FSH en ciertas condiciones. En todo caso, todavía es pronto para poder valorar la importancia fisiológica del GAP (Fink, 1985).

2.1.3.- TRH.-

La capacidad de la TRH como secretagogo de la PRL no tiene discusión, habiéndose descrito la presencia de receptores específicos en los lactotrofos regulados, al menos en parte, por la propia TRH (Hinkle y Tashjian Jr. 1973; Hinkle y Col. 1974; Hinkle y Tashjian Jr. 1975). Sin embargo, la capacidad de la TRH como PRF está estrechamente controlada por la dopamina, quedando completamente bloqueada su acción liberadora de PRL en presencia de un tono dopaminérgico elevado. Este hecho ha sido muy ampliamente descrito en diferentes especies, incluido el hombre (Ferlan y Col. 1980; Quigley y Col. 1980; Fogin y Neill 1981; Plotsky y Neill 1982; Barbadino y Col. 1982; Leong y Col. 1983; Adler y Sokol 1983). En la rata, se ha demostrado una relación dosis/respuesta entre la capacidad estimuladora de la TRH y los niveles de dopamina (Fogin y Neill 1981).

Respecto al papel fisiológico de la TRH como PRF, ha existido una gran controversia (Clemens y Col. 1980; Clemens y Shaar 1980), resuelta en gran medida al conocerse la modulación dopaminérgica de su acción liberadora de PRL. El papel de la TRH en la estimulación de la prolactinemia asociada a la succión mamaria durante la lactancia quedó claramente evidenciado por Greef y Visser (1981). La estimulación del nervio mamario induce una caída del tono dopaminérgico a la vez que un aumento de los niveles de TRH en la sangre del tallo hipofisario que pueden dar cuenta del aumento de la secreción de PRL.

Además de su acción como secretagogo, la TRH ejerce sobre el lactotrofo una modulación positiva de la síntesis de PRL a nivel transcripcional (Rosenfeld y Col. 1983). Este efecto, si bien tiene una iniciación común con el proceso de liberación de la hormona, no está acoplado al mismo, presentando una regulación independiente (Sobel y Tashjian Jr. 1983).

La estimulación de secreción de PRL mediante TRH exógeno (i.v.) bien en bolo o en infusión continua, se utiliza des-

de hace tiempo con fines diagnosticos, fundamentalmente como prueba de funcionalidad hipofisaria y en el diagnóstico de prolactinomas (Jacobs y Col. 1973; Schwinn y Col. 1975; Assies y Col. 1980).

2.1.4.- Serotonina.-

Su implicación en la regulación de la prolactinemia como inductor positivo de la secreción de hormona es ampliamente aceptada. Especialmente en situaciones como la lactancia. Sin embargo no está claro su papel como PRF actuando directamente sobre el lactotrofo, pudiendo estar mediada su acción a través del hipotálamo (Krulich 1979; Clemens y Shaar 1980; Leong y Col. 1983; Raymond y Porter, 1985).

La mayor parte de los trabajos realizados sobre la acción de la serotonina sobre la secreción de PRL se han realizado mediante la utilización de drogas que modifican la función serotoninérgica (precursores de la serotonina, serotonin-agonistas, inhibidores de la captación de la serotonina, bloqueadores de su síntesis, o receptor-antagonistas). Estos trabajos han sido revisados muy recientemente por Müller y Col. (1983).

2.1.5.- Estrógenos.-

Tanto en humanos como en animales de experimentación, en las situaciones de hiperestrogenismo (tanto por causas fisiológicas como farmacológicas) se observa un aumento de la prolactinemia basal así como una mayor respuesta de secreción a la TRH, apreciándose la aparición de un pico de secreción de prolactina característico por las tardes. Estos efectos se deben al potente carácter antidopaminérgico, y por tanto potenciador de la acción de la TRH, que tienen los estrógenos sobre la secreción de PRL (Ferland y Col. 1980; Peillon y Coll. 1982; Leong y Col. 1983). Precisamente, las mayores cifras de prolactinemia basal y mayor capacidad de estimulación por TRH observados en el sexo femenino respecto al masculino se han relacionado con su

mayor nivel de estrógenos (Jacobs y Col. 1973; Spitz y Col. 1983).

La acción antidopaminérgica de los estrógenos a nivel del lactótrofo se refleja a distintos niveles. Por un lado se observa un aumento en el contenido intracelular de PRL, asociado a un incremento de la síntesis de hormona (Maurer 1982) y a una reducción de la tasa de degradación interna (crinofagia; Nansel y Col. 1981). Por otro lado se observa una disminución de la capacidad de la DA para incorporarse a los gránulos secretorios de PRL (Gudelsky y Col. 1980).

2.1.6.- Prolactina.

La PRL ejerce un control inhibitorio sobre su propia secreción tanto a nivel hipotalámico (retroinhibición de asa corta) como del propio lactotrofo (retroinhibición de asa ultracorta).

En el conejo se ha descrito la presencia de receptores específicos para la PRL en el hipotálamo (Carlo y Muccioli, 1981 a y b). En principio, parece que la PRL actúa sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, activándolas. Esta activación tiene dos componentes, uno tónico (rápido) que corresponde a cambios agudos en la prolactinemia, y otro inducido (tardío) que se activa en situaciones de aumento de la prolactinemia más prolongados, y cuya puesta en marcha se asocia a procesos de síntesis proteica (Moore y Col. 1980; Demarest y Col. 1984; Selmánoff 1985). Es interesante destacar que este mecanismo de autocontrol hipotalámico está bloqueado, al menos parcialmente, durante la lactación (Selmánoff y Gregerson, 1984).

A nivel hipofisario, los lactotrofos son capaces de regular su propia secreción mediante un mecanismo sensible a la concentración de hormona ya secretada presente en el medio extracelular (Herbert y Col. 1979; Zacur y Col. 1982; Kadowaki y Col. 1984). La trascendencia fisiológica de este mecanismo de

control no está totalmente clara debido a que esta inhibición tiene lugar en presencia de concentraciones de PRL en el medio externo muy superiores a las que se detectan en la circulación periférica. Sin embargo, según describieron Oliver y Col. (1977), debido a situaciones de reflujo que se producen en la circulación portal hipofisaria, los niveles locales de prolactinemia alcanzarían de sobra los requeridos para mantener un cierto nivel de autosupresión permanente, cuya regulación tendría un papel fisiológico importante en el control de la secreción de la propia hormona, y en definitiva de la prolactinemia (Zacur y Col. 1982). Por otro lado, la PRL parece modular el crecimiento de los lactotrofos en medio de cultivo definido (Hosojima y Wyche, 1985).

2.2.-Catabolismo de la Prolactina.-

Los niveles circulantes de PRL, como los de cualquier hormona, no sólo son función de su tasa de secreción sino que también dependen de su tasa de aclaramiento metabólico (MCR).

En general, los mecanismos implicados en la eliminación de una sustancia de la circulación pueden dividirse en específicos e inespecíficos. En el caso de una hormona, los mecanismos específicos se asocian a la unión a sus receptores específicos en los tejidos diana, dependiendo por tanto de su actividad biológica. Los mecanismos inespecíficos dependen únicamente de las propiedades físico-químicas de la molécula en cuestión, y en el caso de péptidos y proteínas los más importantes son la filtración glomerular, la captación hepática (pinocitosis) y la acción de proteasas circulantes.

En el caso de PRL, estudios en distintos animales de experimentación han demostrado una extraordinaria capacidad por parte del riñón para captar PRL, respecto a cualquier otro órgano o tejido. Con bastante diferencia, en segundo lugar destaca el hígado, siendo también importante la captación por parte de la glándula mamaria en las hembras lactantes. En mucha menor

proporción captan PRL las gónadas y glándulas sexuales accesorias, y la corteza adrenal. (Falconer y Vacek 1983 a y b).

La extracción renal de PRL en la rata se sitúa en torno al 22%, dando cuenta de aproximadamente 2/3 del MCR (Emmanouel y Col. 1981; McKenna y Woolf, 1985), mientras que en humanos la diferencia arterio-venosa de prolactinemia en el riñón es del orden del 16% (Cowden y Col. 1978), observándose una disminución del 33% en el MCR en el caso de enfermos que carecen de función renal (Sievertsen y Col. 1980).

Por su parte, la contribución hepática al MCR de la PRL, tanto en animales de experimentación (Falconer y Vacek 1983 a y b; Basset y Col. 1984) como en humanos (Bratush-Marrain y Col. 1979; Bauer y Col. 1980) no parece especialmente importante, calculándose que su contribución es unas 10-20 veces menor que la del riñón, presentando un componente saturable importante.

2.2.1.- Aclaramiento renal de péptidos y proteínas de bajo peso molecular.-

(Maack y Col. 1979; Carone y Col. 1982; Rabkin y Kitaji 1983).

El catabolismo renal contribuye de forma muy importante a la tasa de aclaramiento metabólico (MCR) de péptidos y proteínas de bajo peso molecular. La vía fundamental de eliminación renal de estas sustancias es la filtración glomerular, existiendo un mecanismo catabólico adicional en el caso de algunas hormonas, debido a su captación por receptores específicos. Este último mecanismo es conocido como catabolismo peritubular o contraluminal.

Las características más importantes del proceso de filtración glomerular son que se trata de un mecanismo de eliminación no saturable e independiente de las propiedades biológicas del material filtrado. El correspondiente coeficiente de filtración depende únicamente de las propiedades físico-químicas

de la sustancia en cuestión (tamaño molecular, configuración y carga), por lo que la cantidad filtrada en condiciones normales es función directa de su concentración plasmática.

Una vez filtrados, los péptidos y proteínas son captados por las microvellosidades de las células tubulares proximales, donde pueden ser hidrolizados parcialmente, formándose vesículas endocitóticas que tras fusionarse con lisosomas (fagolisosomas) conducen a la hidrólisis completa del material peptídico captado. El proceso de absorción proximal de los péptidos y proteínas filtrados es de una enorme eficacia, apareciendo en la orina únicamente el 1-2 % de la cantidad total filtrada.

Las características fundamentales de los mecanismos de degradación renal de péptidos y proteínas de bajo peso molecular se resumen en la Tabla I.

3.- FISIOPATOLOGIA DE LA HIPERPROLACTINEMIA.-

(Carter y Col. 1978; Pepperell 1981; Tourniaire y Col. 1982; Waeber y Col. 1983; Wong y Jones 1984; Buvat y Col. 1985; Caufriez 1985).

Independientemente de su origen, las hiperprolactinemias suelen presentar una sintomatología común, si bien en el caso de un origen orgánico o metabólico (uremia, cirrosis hepática, enfermedad de Addison, síndrome de Cushing, etc) la problemática es mucho más compleja.

Desde el punto de vista de la regulación de la función gonadal, unos niveles circulantes de PRL elevados producen un efecto inhibitorio sobre las mismas acciones que le son propias. Así la hiperprolactinemia se asocia a un retraso de la pubertad

TABLA I

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS CATABOLICOS RENALES DE PEPTIDOS Y PROTEINAS

I.- FILTRACION / RESORCION PROXIMAL.

I.1.- Barrera Glomerular:

- Independencia de la actividad biológica.
- Función de las características físico-químicas de la molécula:
 - Tamaño: - $P_m \leq 70.000 \text{ D.}$
 - R.M.E. * $\leq 42 \text{ \AA.}$
 - Carga neta.
 - Configuración (asimetría).
- Función de la concentración plasmática.
- Influencia de factores hemodinámicos.

I.2.- Resorción Proximal:

- Unión al borde en cepillo de la célula tubular.
- Hidrólisis parcial en el lumen tubular de los péptidos más pequeños.
- Endocitosis.
- Catabolismo intracelular (aminoácidos).
- Resorción y transporte de aminoácidos.

I.3.- Catabolismo Contraluminal:

- Unión a un receptor específico.
- Hidrólisis parcial (fragmentos).
- Internalización.
- Catabolismo intracelular (aminoácidos).

(*) Radio molecular efectivo.

y, en adultos, a un hipogonadismo más o menos acusado, cuya consecuencia más evidente es la infertilidad.

Tanto en el sexo femenino como en el masculino, un exceso de PRL circulante puede asociarse a procesos de ginecomastia y/o galactorrea, si bien la puesta en marcha de estos procesos dependerá de la participación sinérgica y secuencial de otros sistemas hormonales (ver apartado I.1).

Tanto el hipogonadismo, acompañado o no de ginecomastia y/o galactorrea, como las alteraciones en la conducta sexual, asociadas a una situación de hiperprolactinemia, mejoran notablemente o revierten de forma absoluta con tratamientos que normalizan los niveles de PRL circulante, bien quirúrgicos (extirpación de un tumor) o farmacológicos, generalmente con Bromocriptina (Carter y Col. 1978; Ambrosi y Col. 1982; Schwartz y Col. 1982; Tourinnaire y Col. 1982; Kauli y Col. 1985; Rasmussen y Col. 1985).

3.1.- Alteraciones de la función gonadal femenina.-

En el caso del sexo femenino, la hiperprolactinemia induce una situación muy similar a la observada durante la lactancia. La manifestación más evidente en la mayoría de los casos es una situación de amenorrea, si bien a veces simplemente se aprecia una irregularidad menstrual, generalmente con ciclos anovulatorios.

La hiperprolactinemia interfiere la acción de las gonadotropinas sobre la esteroidogénesis, interfiriendo la maduración folicular. Por otra parte, la hiperprolactinemia es capaz de inhibir el proceso de luteinización, así como la propia funcionalidad del cuerpo luteo, deprimiendo la esteroidogénesis (Balmaceda y Col. 1981; Kauppila y Col. 1982; Caufriez 1985).

3.2.- Alteraciones de la función gonadal masculina.-

En el caso del sexo masculino, la hiperprolactinemia

suele acompañarse de un cierto grado de atrofia testicular y un espermiograma alterado.

En las distintas especies estudiadas, incluido el hombre, la alteración más evidente de la hiperprolactinemia es la interferencia de la acción de la LH sobre la síntesis y secreción de testosterona en las células de Leydig de tipo II testiculares (Sharpe y McNeilly 1979; Nakagawa y Col. 1982; Lemarchand-Beraud y Col. 1983; Tresguerres y Col. 1985). A pesar de ello, los niveles circulantes de testosterona sólo están ligeramente disminuidos debido, parece ser, a un catabolismo periférico disminuido, observándose una disminución importante de los niveles circulantes de los metabolitos activos de la testosterona, lo que podría ser la causa última de la disfunción gonadal (Magrini y Col. 1976 y 1979).

3.3.- Hipogonadotropismo.-

Tanto en humanos como en animales de experimentación, de ambos sexos, la hiperprolactinemia crónica se asocia con unos niveles circulantes de gonadotropinas disminuidos, muy evidente en el caso de la LH.

Como se indicó en el apartado 1.2.3, la PRL parece ejercer un control supresor sobre la síntesis y secreción de gonadotropinas, más concretamente sobre la LH. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por una disminución del número de receptores hipofisarios para la GnRH, no descartándose una acción de la PRL a nivel hipotalámico reduciendo la secreción del factor liberador, quizás mediada por la dopamina (Bohnet y McNeilly 1979; Djursing y Col. 1981; Tresguerres y Esquifino 1981; Tresguerres y Col. 1981; Marchetti y Labrie 1982; Cheung 1983; Esquifino y Col. 1984; Caufriez 1985).

3.4.- Alteraciones de la conducta sexual.-

En ambos sexos, la hiperprolactinemia crónica se aso-

cia con una disminución de la libido, que en el caso del sexo masculino se acompaña de una pérdida de potencia y de la capacidad eyaculadora. Además de la posible responsabilidad de las alteraciones endocrinas ya descritas, se ha relacionado la presencia de alteraciones en la conducta sexual con un aumento de la actividad neuronal dopaminérgica a nivel de la región preóptica del hipotálamo (Crosignani y Col. 1980; Weber y Col. 1982; Tourniarire y Col. 1982; Schwartz y Col. 1982; Dudley y Col. 1982; Kalra y Col. 1983; Södersten y Col. 1983 a y b; Oseko y Col. 1983).

La DA parece jugar un papel importante en la actividad sexual de las ratas macho, a través de un mecanismo central (Ferrari y Col. 1985). Esta acción de la DA parece estar mediada por la β -endorfina (β -END), existiendo evidencias importantes sobre el papel fisiológico de la DA como supresora de la secreción de β -END en el hipotálamo (Vermes y Col. 1985). En este sentido, Locatelli y Col. (1983) observaron una disminución del contenido de β -END hipotalámico en ratas tras un tratamiento crónico con bromocriptina o lisuride (DA-agonistas).

Los péptidos opiáceos en general y la β -END en particular parecen estar implicados en la regulación neuronal de diferentes pautas de conducta. En este sentido, existe bastante evidencia de su participación en la regulación neuroendocrina de la función hipofisaria y de algunas respuestas de conducta hormono-dependientes como el comportamiento sexual, tanto masculino como femenino. Concretamente, la β -END parece tener un efecto inhibitorio sobre la receptividad sexual de la rata hembra, si bien esta acción parece mediada por un efecto supresor sobre la secreción de GnRH (Sirinathsinghji 1984). En este sentido, Sarkar y Yen (1985) han observado que la hiperprolactinemia disminuye los niveles de GnRH en el plasma portal hipofisario a través de un mecanismo que parece estar mediado por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, las cuales a su vez aumentan el tono inhibitorio de β -END sobre las neuronas GnRH.

4.- HIPERPROLACTINEMIA UREMICA.-

4.1.- Síndrome Urémico.-

La función primaria del riñón es el mantenimiento de la homeostasis del medio interno. Esta función la realiza mediante la filtración del plasma y manejo posterior del filtrado glomerular. Independientemente de cual sea su origen, la disminución crónica e importante de la función de filtración glomerular (insuficiencia renal) supone una serie de alteraciones del medio interno que constituyen una patología común conocida por "uremia". Cuando la tasa de filtración glomerular desciende por debajo de aproximadamente el 5% del valor normal, es imprescindible recurrir a un tratamiento dialítico periódico para mantener la vida de estos pacientes. Mediante la hemodiálisis o la diálisis peritoneal se consigue un control parcial del equilibrio hidroelectrolítico, y si bien en algunos aspectos la situación de estos pacientes mejora respecto a su situación pre-diálisis, algunas de las alteraciones que componen el síndrome urémico no son corregidas.

El síndrome urémico se caracteriza por toda una serie de alteraciones metabólicas y endocrinas complejas, cuyas manifestaciones clínicas más importantes son anemia, osteodistrofia, hipertensión, neuropatía e hipogonadismo (Hanley y Sherwood 1978; Lim y Col. 1978). Tras un trasplante renal funcionando, la situación de uremia desaparece, así como sus consecuencias clínicas, salvo daño irreversible de algún órgano o tejido particular (Morley y Col. 1978; Lim y Col.. 1980).

4.2.- Hipogonadismo Urémico.-

(Hagen y Col. 1976; Lim y Col. 1978 y 1980; Gómez y Col.1980; Zumoff y Col. 1980; Procci y Col. 1981; Yoshiyama y Col. 1981; Semple y Col. 1982; Matrogiacomo y Col. 1982 y 1984; Weizman y Col. 1983).

La mayor parte de los enfermos urémicos, si no todos, sufren en alguna medida de hipogonadismo. En el caso de los varones, suelen manifestar una disminución de la libido y de la potencia, e infertilidad, observándose alteraciones en el espermograma a veces muy importantes (azoospermia). Las mujeres urémicas premenopáusicas son generalmente infértiles, presentando amenorrea o alteraciones en el ciclo ovárico que suele ser anovulatorio, y aunque menos evidente que en los hombres, suelen manifestar una libido disminuida. En ambos sexos es relativamente frecuente la presencia de ginecomastia y/o galactorrea.

4.2.1.- El eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en la Uremia.-

En el caso de las mujeres premenopáusicas, se observan unos niveles de estradiol, progesterona y FSH comparables a los de las mujeres normales durante la fase folicular del ciclo ovárico, mientras que la LH está ligeramente aumentada. En el caso de los varones, éstos presentan unos niveles de testosterona ligeramente disminuidos o en el límite inferior de la normalidad, estando claramente deprimidos los niveles de testosterona libre (Semple y Col. 1982). Los niveles de FSH suelen ser comparables a los valores normales, mientras que la LH está ligeramente aumentada.

Las pruebas de funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada parecen indicar que la retroinhibición de las hormonas gonadales sobre la secreción tónica de gonadotropinas está conservada, pero mientras el ovario parece mantener su capacidad de respuesta a las gonadotropinas, la respuesta testicular parece estar disminuida. En este sentido, se ha observado una reducción importante del número de receptores para gonadotropinas en un modelo de uremia crónica en ratas (Briefel y Col. 1982). Por su parte, en las mujeres urémicas se suele observar una insensibilidad hipotálamo-hipofisaria al efecto positivo de los estrógenos, responsable de la secreción cíclica de LH, bien por insensibilidad hipotalámica a los estrógenos o bien de la hipófisis a la GnRH (Lim y col. 1980).

4.2.2.- Hiperprolactinemia Urémica e Hipogonadismo.-

(Hagen y Col. 1976; Cowden y Col. 1978; Gómez y Col. 1980; Sievertsen y Col. 1980; Mastrogiacomo y Col. 1982 y 1984; Weizman y Col. 1983; Szücs y Col. 1984; Stegmayr y Skogström 1985).

Un porcentaje relativamente importante de los pacientes urémicos presentan hiperprolactinemia. La incidencia de este fenómeno varía según las series, en función fundamentalmente del rango de normalidad considerado y de la exclusión o no de pacientes en tratamiento con fármacos que pueden modificar la prolactinemia. En el caso de excluir estos últimos pacientes, la incidencia de hiperprolactinemia en varones urémicos es del orden del 20-25%, siendo algo superior en el caso de las mujeres (Gómez y Col. 1980; Mastrogiacomo y Col. 1982 y 1984).

A pesar de que en otras patologías la asociación entre hipogonadismo e hiperprolactinemia está perfectamente clara (Apartado 3), en el caso del síndrome urémico esta relación es mucho menos evidente. Sin embargo, en los distintos casos en que se ha aplicado una terapia con bromocriptina para reducir la prolactinemia, se han obtenido reversiones importantes del hipogonadismo (Bommer y Col. 1978 y 1980; Gura y Col. 1980; Lim y Col. 1980; Gómez y Col. 1980; Weizman y Col. 1983; Szücs y Col. 1984; Stegmayr y Skogström 1985).

Para explicar la poco clara correlación entre hipogonadismo clínico y endocrino observada en la uremia, se ha considerado la implicación de otros factores como la posible acción tóxica del medio urémico sobre las gónadas o la intervención de componentes psíquicos. En este último caso las alteraciones deberán ser específicas del síndrome urémico (Procci y Col. 1981), habiéndose propuesto una alteración de la función dopaminérgica central asociada a la uremia, que justificaría de un lado la hiperprolactinemia y de otro lado el efecto terapéutico de la bromocriptina (Weitzman y Col. 1983). Por último, cabe destacar la hipótesis de Ramirez y Col. (1977), planteando la posibilidad de

encontrar en la circulación del enfermo urémico hormonas (concretamente PRL) parcialmente degradadas que contribuyeran a explicar la poca consistencia entre los datos de laboratorio y la clínica.

4.2.3.- Patogénesis de la Hiperprolactinemia Urémica.-

Como se comentó en el apartado 2.2, el riñón juega un papel fundamental en la tasa de aclaramiento metabólico de la PRL. Indudablemente, la disminución o ausencia de función renal está implicada en el aumento de los niveles circulantes de distintas sustancias (Katz y Emmanouel, 1978; Maack y Col. 1979; Emmanouel 1983), sin embargo, de todas las series de enfermos con insuficiencia renal no terminal descritas, únicamente Cowden y Col. (1978) pudieron observar una cierta correlación entre grado de función renal y niveles de PRL circulante. Los resultados de estos estudios no sugieren que la falta de catabolismo renal de la hormona sea la causa fundamental de la hiperprolactinemia urémica. Por otra parte, al estudiar la función hipotálamo-hipofisiaria en relación a la secreción de PRL, se observa una hiporrespuesta muy evidente tanto a las pruebas de estímulo con TRH y otros secretagogos, como a las de supresión bien con dopamina, bromocriptina (dopamino-agonista) o L-dopa (precursor de la dopamina) (Ramírez y Col. 1977; Lim y Col. 1979; Leroith y Col. 1979; Gómez y Col. 1980; Sievertsen y Col. 1980; Peces y Col. 1981; Lunetta y Col. 1981; Schmitz y Møller, 1983; Schmitz 1984). Estos hechos se han considerado como una evidencia de una disfunción hipotálamo-hipofisaria asociada a la situación de uremia, reversible tras un transplante renal funcionante.

Sievertsen y Col. (1980) cuantificaron las tasas de secreción y de aclaramiento metabólico de PRL en un grupo de enfermos en programa de hemodiálisis y en un grupo de controles sanos. Sus resultados indican que si bien la MCR de los enfermos urémicos está disminuida en un 33%, su tasa de producción de PRL está aumentada alrededor de un 200% respecto a los controles.

En ratas con uremia aguda (24h de nefrectomía bilateral), McKenna y Woolf (1985) han observado una resistencia a la supresión dopaminérgica de la secreción de rPRL. Estos animales, a pesar de ofrecer evidencias de tener un mayor tono dopaminérgico que los controles seudooperados (SO), presentan hiperprolactinemia. Además, el bloqueo de la síntesis de DA con α -metil-p-tirosina induce una hiperprolactinemia sensiblemente mayor que la observada en los animales controles y que excede a la explicable en base a una MCR reducida en torno al 60%. La infusión de DA reduce significativamente esta hiperprolactinemia, pero mientras en las ratas controles (SO) los niveles de PRL circulante se aproximan a la normalidad, los animales anéfricos mantienen una hiperprolactinemia importante. Estos autores sugieren una acción de la uremia a nivel del lactotrofo que, incluso agudamente, induce una resistencia a la supresión dopaminérgica de la secreción de PRL.

Así las cosas, sin negar la importancia de la falta de catabolismo renal de la hormona, la hipótesis generalmente aceptada hasta la fecha sobre la patogénesis de la hiperprolactinemia urémica considera su causa fundamental un aumento de su secreción, relacionado con la situación de uremia, consecuencia de una cierta autonomía hipofisaria respecto de los sistemas de control de la prolactinemia.

5.- ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA.-

La PRL, como otras hormonas polipeptídicas, presenta un polimorfismo relativamente importante en las distintas especies estudiadas, incluida la humana.

5.1.-PRL Nativa.-

La PRL se sintetiza como pre-hormona. En el caso del hombre, la pre-PRL tiene 227 aminoácidos (25.880 Da) y la pérdida de los 28 primeros da lugar a la hPRL nativa (22.500 Da). La estructura primaria de la PRL ha sido determinada mediante se-

cuenciación peptídica para diferentes especies (Shome y Parlow, 1977; Kohmoto y Col. 1984) y mediante el análisis de un cDNA en el caso de la hPRL (Cooke y Col. 1981) y la rPRL (Malcolm, 1981), apreciándose un importante grado de homología entre las distintas especies estudiadas. Todas las PRLs conocidas tienen 3 puentes disulfuro intracatenarios dando lugar a tres anillos denominados N-terminal, central y C-terminal, y que corresponden a la unión entre las Cys 4-11, 58-174 y 191-199 en el caso de las hPRL y oPRL, mientras que en la rata y ratón las Cys unidas ocupan las posiciones 4-9, 56-172 y 189-197.

5.2.- Polimorfismo de la PRL.-

En principio, dado que no parece existir más de un gen para la PRL, no cabe hablar de isohormonas, sino de variantes que deben ser consideradas como modificaciones postraduccionales de la PRL nativa (Lewis, 1984).

5.2.1.- Formas de PRL con diferente tamaño molecular.-

En todas las especies estudiadas, al analizar mediante cromatografía de exclusión molecular en gel de Sephadex G-100 la PRL inmunoreactiva presente tanto en suero o plasma como en extractos de pituitarias o medios de incubación de tejido hipofisario, se observan hasta 3 picos que eluyen con unos coeficientes de reparto (K_{av}) aproximados de 0, 0.2 y 0.4. Aunque en un principio se les dió distintas denominaciones, hoy se conocen como PRLs grande-grande, grande y pequeña, respectivamente. (Rogol y Rosen, 1974; Suh y Frantz, 1974; Guyda 1975; Farkouh y Col. 1979; Lawson y Col. 1980; Lawson y Stevens, 1980; Soong y Col. 1982; Lawson y Col. 1984; Haisenleder y Col. 1984; Pansini y Col. 1985).

Por su parte, tanto en humanos como en ratas, mediante la aplicación de técnicas electroforéticas se han aislado y purificado hasta 4 variantes de PRL inmunorreactiva, con diferente tamaño molecular, a partir de extractos hipofisarios (Nyberg y

Col., 1982; Meuris y Col. 1983 y 1984). Estas formas de PRL se han denominado 16K, 23K, 29K y 45K, haciendo referencia a su peso molecular aparente aproximado en kilodaltones. En condiciones reductoras, unicamente se detectan las bandas correspondientes a las formas 23K y 16K.

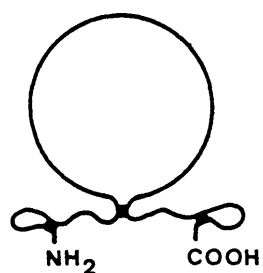
5.2.2.- Variantes de carga de la PRL.-

La combinación de técnicas de electroforesis e isoelectroenfoque ha permitido separar diferentes variantes de carga de la PRL pequeña (23K) a partir tanto de extractos como de medio de incubación de hipófisis en distintas especies, incluida la humana (Sinha y Baxter 1979; Nyberg y Col. 1980; Cheng y Col. 1981; Nyberg y Col. 1982; Haro y Talamantes 1985a). En general se detectan tres variantes que se diferencian en 1 y 2 cargas netas respecto a la más básica, considerada como la PRL nativa que es generalmente la forma mayoritaria. Habitualmente se denominan PRLs I, II y III, en orden creciente de acidez. También en el caso de la rPRL grande, Nyberg y Col. (1982) han descrito la presencia de hasta 4 variantes de carga mediante electroforesis en suspensión de agarosa, en extractos de hipófisis de rata.

5.2.3.- PRL abierta.-

En 1980 (a y b) Mittra describió una variante de rPRL 23K con la peculiaridad de tener abierto su anillo central (56-172) en algún punto entre los aminoácidos 130 y 140, de forma que queda constituida por dos cadenas denominadas 8K (C-terminal) y 16K (N-terminal) con un puente disulfuro intracatenario cada una, y unidas a su vez por un enlace disulfuro intercatenario. Esta variante, denominada PRL abierta, parece que podría tener un papel fisiológico especialmente importante como se comentará en el apartado 5.4 de esta introducción. Recientemente, Sinha y Gilligan (1984) han descrito la presencia de una mPRL abierta en hipófisis de ratón con iguales características que la de rata. En la figura 1 se muestra un esquema de la relación estructural entre la PRL nativa y la PRL abierta.

PRL NATIVA (monocatenaria; 23K)



PRL ABIERTA (bicatenaria; 16K + 8K)

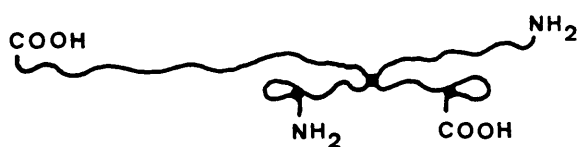


Fig. 1.- Esquema de la relación estructural entre la PRL nativa y la PRL abierta descrita por Mittra (1980 a y b) y - Sinha y Gilligan (1984).

5.2.4.- Formas glicosiladas de PRL.-

En 1983, Shoupe y Col. describieron la presencia en plasma de mujeres gestantes y en medio de incubación de tumores hipofisarios una fracción de hPRL grande con la característica de ser retenida en una columna de sepharosa-concanavalina A, lo que sugería la presencia de un componente hidrocarbonado. Posteriormente, Sinha y Col. (1984) han descrito una forma glicosilada de hPRL (G-hPRL) circulante, que en SDS-PAGE da una banda diferenciable de la hPRL 23K con un peso molecular aproximado de 25.000 Da. También en 1984, Lewis y Col. han descrito una G-oPRL de similares características en hipófisis de oveja, y acaban de publicar (Lewis y Col. 1985) el aislamiento y purificación de una G-hPRL a partir de hipófisis humanas. Tanto en el caso de la G-oPRL como en el de la G-hPRL hipofisarias, parece que se trata de las formas nativas 23K con una unidad hidrocarbonada unida a un resto de Asn situado en la posición 31 (Lewis y Col. 1985),

Basados en los trabajos de Lewis y Col. Strickland y Pierce (1985) han realizado estudios sobre la glicosilación de la PRL durante la biosíntesis en un sistema libre de células, así como sobre la PRL producida en experimentos en que la síntesis de PRL iniciada "in vivo" era completada "in vitro" (fracción microsomal hipofisaria). Estos autores han aislado dos formas glicosiladas de oPRL unos 2700 y 4400 Da mayores que la oPRL 23K; sin embargo, no han podido encontrar formas glicosiladas de bPRL, probablemente porque la bPRL tiene un residuo de Asp en lugar de Asn en la posición 31 de su secuencia peptídica.

5.3.- Relación entre las distintas variantes de PRL descritas.-

Tanto la bioquímica como la fisiología de las distintas formas de PRL descritas son poco o nada conocidas. Como referencia vamos a considerar la distribución de la PRL inmunoreactiva en una cromatografía de exclusión molecular en gel de Sephadex G-100.

5.3.1.- PRL pequeña.-

En principio corresponde a la PRL 23K, incluyendo las distintas variantes de carga (PRLs I,II y III) la PRL abierta y probablemente la forma glicosilada (G-PRL) monoméricas. En principio, las PRLs II y III son consideradas como formas desamidadas de la PRL-I que parece ser la hormona nativa, sin embargo la PRL abierta también podría constituir una parte de las variantes de carga descritas (Mitra, 1980 b).

La variante 16K descrita en hipófisis por Meuris y Col. (1983 y 1984) y que constituía alrededor del 0.1% de la PRL inmunorreactiva total extraída, coincide con la cadena 16K de la PRL abierta. En todo caso parece poco probable su presencia en la circulación. Por su parte, la forma 29K podría corresponder a la G-PRL dado que parecen tener un comportamiento electroforético muy similar (Lewis y Col. 1985).

La PRL pequeña constituye el 80-95% del total de PRL inmunorreactiva presente en extractos de hipófisis o medio de incubación de tejido hipofisario. En humanos, la contribución de la hPRL pequeña a la prolactinemia total es en general del 60-80%, pudiendo alcanzar el 100%.

5.3.2.- PRL grande.-

Se corresponde con la PRL 45K y parece tratarse de un dímero de PRL pequeña, unidas ambas subunidades por puentes disulfuro (Benveniste y Col. 1979; Nyberg y Col. 1982; Meuris y Col. 1983 y 1984). Probablemente se trata de una fracción heterogénea ya que hay una parte fácilmente reducible y otra más resistente (Meuris y Col. 1983 y 1984). Por otra parte, en hipófisis de rata se han descrito hasta 4 variantes de caga de rPRL grande (Nyberg y Col. 1982), y en humanos Shoupe y Col. (1983) describieron una hPRL grande glicosilada circulante.

En extractos hipofisarios, la PRL grande da cuenta del

10-25% del total de PRL inmunorreactiva, mientras que en medio de incubación de hipófisis constituye alrededor del 5% del total de hormona secretada. En humanos, la contribución de la hPRL grande a la prolactinemia total suele ser alrededor del 20%, si bien a veces no es detectable.

5.3.3.- PRL Grande-grande.-

Su estructura no ha sido apenas estudiada, considerándose una combinación de agregados de PRL pequeña, y quizás PRL grande, probablemente con otros componentes de carácter proteico. Unicamente Nyberg y Col. (1981) han estudiado con algo de detalle la hPRL grande-grande extraída de hipófisis. Estos autores, mediante electroforesis de zona separaron hasta cinco componentes a su vez heterogeneos. En todos los casos, las fracciones separadas estaban constituidas por hPRL pequeña unida a otros componentes, parte por puentes disulfuro y parte por uniones de tipo no covalente. Para estos autores, la hPRL grande-grande es, al menos parcialmente, un componente natural de la hipófisis, sin embargo su origen hipofisario no está claramente establecido.

En extractos de hipófisis no siempre se detecta la presencia de PRL grande-grande, si bien puede llegar a constituir hasta un 5% de la hormona total. En medio de incubación de tejido hipofisario, esta forma molecular aparece únicamente en forma de trazas. En humanos, la hPRL grande-grande constituye entre el 0-30% de la prolactinemia, siendo relativamente frecuente que no se detecte.

5.4.- Actividad biológica de las distintas variantes de PRL.-

Para valorar la actividad biológica de la PRL se han utilizado distintos bioensayos, en general los resultados se suelen referir a la inmunorreactividad presente en la muestra. Los resultados obtenidos son relativamente contradictorios, ello parece debido tanto a la heterogeneidad molecular de la hormona,

y los problemas de inmunorreactividad que ello conlleva, como a la heterogeneidad biológica que parece justificar, al menos en parte, la diversidad molecular (Mitra 1980b; Lewis 1984; Lewis y Col. 1984).

5.4.1.- Bioensayos de PRL.-

Fundamentalmente, se han utilizado tres bioensayos cuantitativos diferentes. El primero fue desarrollado por Nicoll (1967) y está basado en la acción trófica de la PRL sobre el epitelio mucosal del buche de paloma (BA). Posteriormente, Shiu y Col. (1973) desarrollaron un radioreceptorensayo (RRA) en el que se realiza un análisis de competición con PRL- I^{125} por la unión a su receptor específico (fracción microsomal) de glándula mamaria de conejo o de hígado de rata hembra (Posner y Col. 1974). Recientemente, Tanaka y Col. (1980) han descrito un bioensayo para PRL, bastante más sensible, basado en la capacidad de la PRL para estimular la replicación de las células del linfoma de rata Nb₂-Node (Nb₂-BA).

5.4.2.- Valoración de la actividad biológica de la PRL total.-

En el caso de la rPRL, lo mismo que se utilice el BA de Nicoll que un RRA o el Nb₂-BA, al analizar tanto sueros como medios de incubación de hipófisis de rata, se han encontrado muy buenas correlaciones entre las medidas de los bioensayos y la inmunorreactividad. Sin embargo, dependiendo de la situación físiopatológica el valor de la relación BA/RIA oscila entre 1 y 11, y en el caso de la Nb₂-BA/RIA varía entre 0.2 y 5. En general la relación bioensayo/inmunoensayo es mayor en los sueros que en medios de incubación de hipófisis. (Asawaroengchai y Nicoll 1977; Leung y Col. 1978; Leung 1980; Klindt y Col. 1982). En el caso de extractos hipofisarios parece que la forma de preparación de las muestras puede influir en los resultados (Asawaroengchai y Col 1978), lo que explicaría que en unos casos se encuentre correlación bioensayo/inmunoensayo (Leung 1980) y en otros no (Asawaroengchi y Nicoll 1977).

En humanos, tanto Shiu y Col (1973) como Tanaka y Col. (1980) al analizar sueros tanto de controles como de pacientes con distintas patologías relacionadas con la PRL, obtenidos en condiciones basales o tras un estímulo de secreción han encontrado muy buenas correlaciones entre sus respectivos bioensayos (RRA y Nb₂-BA) y el RIA. Los resultados obtenidos con el Nb₂-BA han sido confirmados por Rowe y Col en 1983, encontrando una relación Nb₂-BA/RIA muy próxima a la unidad, con la excepción de un caso que se comenta en el próximo apartado.

Recientemente, Anderson y Col. (1984) y McNeilly y Friesen (1985) han descrito la presencia de un factor sérico que potencia la actividad biológica de la PRL determinada mediante el BA de Nicoll o el Nb₂-BA. Este factor (o factores) parece carecer de actividad lactogénica intrínseca, actuando en sinergismo con la PRL, por lo que Anderson y Col. (1984) lo denominaron "Sinlactina", y podría justificar las variaciones observadas en la relación BA/RIA y Nb₂-BA/RIA sérica para distintas situaciones fisio/patológicas.

5.4.3.- Actividad biológica de las PRLs pequeña, grande y grande-grande.-

Analizadas las formas de hPRL pequeña y hPRL grande obtenidas de dos sueros de pacientes portadores de un tumor secretor de hPRL, Guyda (1975) observó en ambos casos una relación RRA/RIA aproximadamente de 1, dando ambas formas moleculares curvas de dosis /respuesta paralelas tanto en RRA como en RIA. Sin embargo, utilizando métodos equivalentes, tanto Garnier y Col. (1978) como Farkouh y Col. (1979) encontraron una actividad RRA sensiblemente menor para las hPRLs grande y grande-grande respecto la hPRL pequeña, alrededor del 25% y el 14% respectivamente.

Utilizando el Nb₂-BA, Whitaker y Col. (1984) en un estudio similar encontraron unos valores de Nb₂-BA/RIA de 0.93, 0.87 y 0.69 para las hPRLs pequeña, grande y grande-grande, res-

pectivamente. Rowe y Col. (1983), utilizando el mismo bioensayo, al estudiar la actividad biológica de la hPRL grande de dos pacientes portadores de un tumor secretor de PRL en los que la mayor parte de la hormona inmunorreactiva circulante correspondía a esta forma de hPRL, encontraron que mientras en un caso la relación NB₂-BA/RIA era aproximadamente de 1, en el otro era de 2.5.

En el caso de la rata, Nyberg y Col. (1982) al estudiar la rPRL grande extraída de hipófisis encontraron que su actividad biológica en RRA era aproximadamente el 75% de la del estándar. Por su parte, Haiscnleder y Col. (1984) refieren (sin dar datos) que la rPRL grande-grande es biológicamente activa en el NB₂-BA.

Finalmente cabe destacar que, desde el punto de vista clínico, existe cierta evidencia de que la presencia de una hiperprolactinemia ligera o moderada sin manifestaciones clínicas suele coincidir con una participación importante de la hPRL grande y/o grande-grande en la inmunorreactividad total circulante (Rogol y Rosen 1974; Whittaker y Col. 1981; Andersen y Col. 1982; Soong y Col. 1982; Rowe y Col 1983; Larrea y Col. 1985). Para explicar esta observación, Andersen y Col. (1982) han propuesto la hipótesis de un menor espacio de distribución de las formas de mayor tamaño molecular, respecto a la hPRL pequeña. Efectivamente, para cumplir su papel fisiológico la hormona debe alcanzar su célula diana, para lo que debe abandonar el lecho vascular, estando limitado este paso hacia el líquido intersticial por el propio tamaño molecular de la hormona. Esta limitación debe ser muy evidente en el caso de la PRL grande-grande, cuyo tamaño molecular es aún mayor que el de la albúmina, por lo que su volumen de distribución no debe ser significativamente mayor que el volumen plasmático.

5.4.4.- Actividad biológica de las variantes de carga de la PRL.

Los resultados obtenidos son bastantes contradictorios. Tanto en el caso de PRL humana (Nyberg y Col. 1980) como

de la rata (Nyberg y Col. 1982) al estudiar las PRLs I, II y III purificadas de extractos hipofisarios, se ha encontrado una mayor actividad biológica según aumenta la acidez de la molécula, al tiempo que disminuye la inmunorreactividad. Este efecto es muy evidente en el caso de la hPRL-III. Sin embargo, en el caso de la oveja, las distintas variantes de carga de oPRL purificadas de extractos hipofisarios, han mostrado el fenómeno inverso observándose una pérdida de actividad biológica según aumenta la acidez de la molécula, al tiempo que su inmunorreactividad o bien aumenta (Cheng y Col. 1981), o bien no varía sustancialmente (RIA heterólogo; Haro y Talamantes, 1985b). Por último, en el caso del ratón, al estudiar las mPRL I, II y III extraídas de hipófisis (Sinha y Baxter 1979) se observa una mayor actividad biológica a medida que aumenta la acidez de la molécula, mientras que preparadas las variantes de carga a partir de medio de incubación de hipófisis el resultado obtenido por Haro y Talamantes (1985b) es el contrario, observando una pérdida neta de actividad biológica según aumenta la acidez de las variantes. Es importante destacar que en los casos en que se han utilizado distintos bioensayos en un mismo estudio los resultados son coincidentes.

Probablemente la diversidad de los resultados es el reflejo de la propia heterogeneidad de estas variantes de la PRL. Como ya se indicó (apartado 5.3.1.) las variantes de carga parecen ser fundamentalmente formas desamidadas de la forma nativa (PRL-I). Lo que no está nada claro es que las desamidaciones tengan carácter específico o incluso que estas formas desamidadas existan realmente "in vivo", pudiendo tratarse de artefactos producidos por la manipulación de las muestras (Asawaroengchai y Col. 1978), dada la facilidad que parece tener la hormona para desamidarse espontáneamente (Haro y Talamantes 1985b). Sin embargo, también puede tratarse de un proceso de envejecimiento natural, o de un paso previo en el proceso de degradación interno de la hormona (Nyberg Col. 1982; Haro y Talamantes 1985b).

5.4.5.- Actividad biológica de la PRL abierta.-

La rPRL abierta descrita por Mittra (1980a y b) presenta la peculiaridad respecto a todas las preparaciones de PRL ensayadas hasta entonces de presentar una potente actividad mitótica sobre el epitelio mamario "in vivo" en concentraciones fisiológicas, estando asociada esta actividad a su fragmento 16K. Hasta entonces las distintas pruebas, tanto "in vivo" como "in vitro", realizadas con diferentes preparados de PRL habían demostrado una fuerte actividad lactogénica, pero no presentaban una actividad mamogénica significativa en concentraciones fisiológicas. Este hecho conducía a la hipótesis de que la apertura del anillo disulfuro central hace a la PRL asequible a un receptor mamario específico que media la expresión de su función mamogénica (Mittra 1980b).

OBJETIVOS.-

A pesar del reconocimiento del importante papel del riñón en el catabolismo de péptidos y proteínas de bajo peso molecular, a la hora de valorar las causas subyacentes a la hiperprolactinemia urémica, la hipótesis generalmente aceptada considera como origen fundamental de esta alteración una disfunción hipotálamo-hipofisaria mediada por la situación de uremia. Sin embargo, esta hipótesis se basa en una serie de estudios que, analizados con cierto detalle, contiene imprecisiones importantes, bien en el planteamiento o bien en la valoración de los resultados. Por otra parte, en ningún caso se ha valorado en la uremia el hecho del polimorfismo que presenta la prolactina.

Ante esta situación, nos planteamos profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la hiperprolactinemia urémica. En concreto nos fijamos los siguientes objetivos:

- 1.- Valorar la importancia de la ausencia de catabolismo renal de la hormona frente a una posible influencia de la propia situación de uremia.
- 2.- Dentro de la valoración del catabolismo renal, estudiar la contribución relativa de los procesos de filtración glomerular y de catabolismo peritubular. Para la realización de estos dos primeros objetivos hemos utilizado diferentes modelos de uremia aguda en ratas.
- 3.- Estudiar el polimorfismo de la prolactina circulante en la uremia, valorando la contribución de sus variantes pequeña, grande y grande-grande al aumento de la prolactina asociada a la insuficiencia renal. Este estudio se ha realizado tanto en modelos de uremia aguda en ratas, como en enfermos con distintos grados de insuficiencia renal.
- 4.- Valorar si realmente existe en la uremia una alteración hipofisaria en la respuesta de secreción de prolactina frente a un estímulo agudo con TRH, considerando la heterogeneidad de la hormona. Este estudio se ha realizado en pacientes con diferentes grados de función renal.

- 5.- Valorar la capacidad de aclaramiento metabólico de las distintas variantes de la hormona en la uremia y su relación con la tasa de filtración glomerular. Este estudio se ha realizado en los mismos pacientes que el objetivo 4.

1.- ESTUDIOS EN RATAS.-

1.1- Animales de experimentación.-

Se utilizaron ratas macho de raza Wistar, de un peso entre 200 y 250 gramos, procedentes del animalario de la Fundación Jiménez Díaz. Los animales fueron alojados en cajas metabólicas individuales con libre acceso a la comida y al agua.

1.1.1.- Modelos experimentales.-

Se desarrollaron tres modelos de uremia aguda experimental:

- a) Nefrectomía bilateral (NBx): Extracción de ambos riñones mediante lumbotomía bilateral.
- b) Ligadura bilateral de uréteres (LBU): Ligadura de ambos uréteres con dos suturas de seda cada uno, a través de una laparotomía media.
- c) Autoinfusión de orina (AO): Después de ligada la uretra, mediante laparotomía media, se localizaba la vejiga urinaria, canulándose con un cateter de polietileno (PE 50, Vygon, Francia). El otro extremo del cateter, después de ser tunelizado bajo la piel, era introducido en la vena femoral izquierda, permitiendo a la orina reinfundirse a la circulación sanguínea.

1.1.2.- Controles.-

Se utilizaron dos tipos de controles:

- a) Ratas pseudo-operadas (SO): Sometidas a laparotomía media y ligera manipulación de las vísceras. Este tipo de controles únicamente se utilizaron en el primer estudio.

b) Ratas controles intactas (C): No sometidas a ningún tipo de intervención quirúrgica.

1.1.3.- Comprobación de la efectividad de los modelos.-

La eficacia de la LBU era comprobada en todos los casos. No se recogía orina en las cajas metabólicas, y después de sacrificadas las ratas se confirmaban las ligaduras, observándose dilatación ureteral.

La efectividad de la AO se verificaba "post-mortem" en todos los casos. Se comprobaba al permeabilidad de la derivación vesico-femoral y la ausencia de dilatación ureteral.

1.1.4.- Manipulación general de los animales.-

a) Acostrumbamiento al manejo:

Las ratas eran manejadas diariamente durante aproximadamente un minuto durante la semana anterior al sacrificio (entre las 09.00 y las 11.00 horas de la mañana).

b) Cirugía:

Todas las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo bajo una ligera anestesia con éter, en condiciones higiénicas pero no estériles; el material quirúrgico era tratado con una solución 1/1000 de cloruro de benzalconio (Armil) durante dos horas antes de la operación. Después de haberse recuperado de la anestesia, los animales fueron puestos de nuevo en las cajas metabólicas.

c) Sacrificio y recogida de muestras:

Las ratas se sacrificaron por decapitación dos días después de operadas entre las 09.00 y las 11.00 horas de la mañana. La muerte tenía lugar dentro de los primeros 20 segundos después de sacar al animal de su caja metabólica. Se recogía una mezcla de sangre arterio-venosa en tubos previamente enfriados que contenían 100 μ l de heparina sódica 1%. Tras centrifugar a

+4°C, el plasma se separó y se congeló, conservándose a -20°C hasta el momento de ser analizado.

1.1.5.- Estudio de la posible influencia de la orina autoinfundida sobre la rPRL inmunorreactiva circulante.-

Se preparó una rata AO, a la que se implantaron dos catéteres independientes en vejiga y vena femoral izquierda, tunelizándose ambos hasta la parte dorsal del cuello donde se conectaron entre sí mediante una aguja siliconizada (\varnothing int. 0.3 mm, \varnothing ext. 0.5 mm, 9.6 mm de longitud) quedando esta unión expuesta al exterior y debidamente atada a la piel. Unas 40 horas después de establecida la derivación, se abrió la conexión recogiendo unos 10 ml de orina en 30 min.

Dos muestras de 2 ml de plasma procedentes de ratas C y NBx respectivamente, se incubaron con 0.5 ml de la orina de la rata AO descrita, durante 4 h a 37°C. Se tomaron alícuotas de 250 μ l a las 0, 0.5, 1, 2 y 4 h de incubación. Estas alícuotas eran congeladas inmediatamente, conservándose a -20°C hasta ser analizadas. Todas las muestras se analizaron simultáneamente.

1.2.- Cromatografía de penetrabilidad molecular.-

Se utilizaron columnas de 90 cm (2.01 cm^2) de sephadex G-100 (40-120 μ m) equilibradas y eluidas con tampón fosfosalino (fosfato 0.01 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, NaN_3 0.1%) conteniendo 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA), pH=7.6. La elución de las columnas se realizó por gravedad a +4°C, manteniendo un flujo de 11-15 ml/h. Se aplicaron muestras de 2.5 ml de plasma, recogiendo fracciones de 1.5 ml.

1.2.1.- Calibrado de las columnas.-

Las columnas fueron calibradas periódicamente con los siguientes marcadores: BSA- I^{125} (Pm=66000Da), Ovoalbúmina marcada con fluoresceína (Pm=45000 Da), rPRL- I^{125} (Pm=23000 Da), citocro-

mo C (Pm=13000 Da) e Insulina humana-I¹²⁵ (Pm= 6000 Da). En todas las eluciones se añadieron a la muestra pequeñas cantidades de inmunoglobulina G humana marcada con I¹²⁵ (Pm=150000 Da) y NaI¹²⁵ para marcar el volúmen de exclusión (Vo) y el volúmen vacío (Vt) respectivamente.

1.2.2.- Preparación de los marcadores.-

La preparación de los distintos marcadores radiactivos se realizó según el método descrito por Hunter y Greenwood (1962), según se detalla más adelante para la rPRL-I¹²⁵ (apartado 1.3.1).

El conjugado de ovoalbúmina con fluoresceína se preparó según la metodología descrita por Hudson y Hay (1976). Cuarenta mg de ovoalbúmina y 2 mg de isotiocianato de fluoresceína se dejaban reaccionar en 2 ml de tampón carbonato 0.25 mol/l pH=9.0, durante una noche a +4°C, manteniendo agitación rotacional suave. La proteína conjugada se separaba del fluorocromo libre mediante cromatografía de penetrabilidad molecular en sephadex G-75 (40-120 μ m; 15 cm x 0.64 cm²) equilibrado y eluido con tampón fosfosalino (fosfato 0.01 mol/l NaCl 0.15 mol/l NaN₃ 0.1%) pH=7.6 a +4°C.

1.2.3.- Expresión de los resultados cromatográficos.-

En todos los casos, los resultados de volúmen de elución se expresan en forma de coeficiente de reparto (Kav), que para una sustancia X se define:

$$K_{av} = \frac{V_x - V_o}{V_t - V_o}, \text{ donde}$$

V_x= Volúmen de elución de la sustancia X

V_o= Volúmen de exclusión de la columna, marcado por la inmunoglobulina G humana-I¹²⁵.

V_t= Volúmen vacío de la columna, marcado por el NaI¹²⁵.

1.3.- Determinación de la rPRL.-

El contenido en rPRL de plasmas y eluidos cromatográficos se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA), utilizando una técnica de doble anticuerpo. El primer antisuero, el estándar y la hormona para radioyodación fueron cedidas por el Rat Pituitary Hormone Distribution Program del NIAMDD (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases, USA) a través del Dr. A.F. Parlow. Como segundo anticuerpo se utilizaron distintos lotes de un suero de carnero anti-inmunoglobulina G de conejo preparado en el laboratorio ó comercial (Antibodies Inc.). Las condiciones generales del RIA se basaron fundamentalmente en la información que acompañaba a los reactivos del NIAMDD.

1.3.1.- Preparación del trazador.-

Para la preparación del trazador se utilizaron dos lotes diferentes de prolactina de rata cedidos por el NIAMDD (rPRL I-3 e I-5). Sus características más importantes son:

- Potencia biológica: Aproximadamente 30 UI/mg.
- Contaminación por GH: < 0.1 UI/mg.
- Contaminación por TSH: < 0.1 UI/mg.

La radioyodación se realizó mediante una modificación del método de Hunter y Greenwood (1962) utilizando cloramina T como oxidante y metabisulfito sódico como reductor. El tiempo de reacción fué de 30 segundos y las concentraciones de los reactivos en un volumen de reacción final de 80 μ l eran:

- rPRL (2.5 μ g)	$\sim 1.5 \times 10^{-6}$	mol/l
- I^{125} (~ 0.5 mCi = 18.5 MBq)	$\sim 3 \times 10^{-6}$	mol/l
- Cloramina T	4.12×10^{-4}	mol/l
- Fosfato (pH=7.6)	0.228	mol/l

La reacción se detenía con la adición de 50 μ l de $Na_2S_2O_5$ 2.6×10^{-3} mol/l en tampón fosfato 0.05 mol/l, pH=7.6. A continuación se añadían 100 μ l de una solución de KI 1%, sacarosa 8%.

Terminado el marcaje, la mezcla final se aplicaba a una columna de sephadex G-75 (40-120 μ m; 15 cm x 0.64 cm²) equilibrada y eluida con tampón borato 0.01 mol/l, pH= 8.6, recogiendo fracciones de 0.5 ml sobre 100 μ l de tampón fosfosalino (fosfato 0.01 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, NaN₃ 0.1% con un 1% de ovoalbúmina, pH=7.6). En todos los casos se escogieron las alícuotas correspondientes al máximo y primera parte descendente del pico de radiactividad ligada a la hormona, fracciones que presentan mayor inmunorreactividad.

La actividad específica, calculada a partir del % de radiactividad incorporada a proteína variaba entre 30 y 50 μ Ci/ μ g (1.11 - 1.85 MBq/ μ g).

1.3.2.- Preparación de un suero de carnero anti-IgG de conejo.-

La IgG de conejo se preparó a partir de unos 30 ml de suero mediante una modificación del método de Peterson y Sober (1962). Dializado el suero frente a tampón fosfato 0.01 mol/l, pH=7.6 (Visking 22/32) a +4°C, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (DE-11; 40 cm x 19.6 cm²) equilibrada y eluida con el mismo tampón fosfato, recogiendo fracciones de 5 ml. Aquellas fracciones con una DO > 0.1 (λ = 280 nm) se concentraron por ultrafiltración a presión negativa, controlándose la pureza de la preparación mediante inmunolectroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón barbital 0.035 mol/l, pH= 8.6 (Inmunolectrofilms Kallestad) observándose una única banda de precipitación en la zona anódica, característica de la IgG, al enfrentar a un suero anti-suero total de conejo (Behring).

La pauta utilizada para inmunizar al carnero (33 Kg) fue la siguiente: Una vez a la semana y durante 4 semanas consecutivas se inyectaron 2 mg de IgG de conejo (1 mg/ml) previamente agregada a 69.5°C (1 hora), diluida 1:3 en adyuvante completo de Freund, por vía intramuscular, en las patas traseras o delanteras alternativamente. La 5ª semana se extrajo una muestra de

sangre para control y la 7ª semana se procedió a una hiperinmunización:

- Día 1: 10 mg de IgG de conejo en 10 ml de NaCl 0.15 mol/l estéril, intraperitoneal.
- Día 2: 2 mg de inmunógeno en 10 ml de NaCl 0.15 mol/l estéril, intravenoso.

A la 8ª semana se realizó la primera extracción de aproximadamente 500 ml de sangre. Continuándose el proceso de hiperinmunización y sangrías sucesivas. El suero se almacenaba en alícuotas a -20°C hasta su utilización.

1.3.3.- Estándares.

Se utilizaron dos preparaciones de referencia diferentes. En el primer estudio se utilizó como estandar la NIAMDD-Rat prolactin-RP-1. Esta preparación tenía una potencia biológica de aproximadamente 11 UI/mg. Posteriormente, la preparación utilizada como estandar fue la NIAMDD-Rat prolactin-RP-2, cuya potencia biológica era de aproximadamente 30 UI/mg.

1.3.4.- Procedimiento analítico.

En el procedimiento habitual de un RIA se añadían los siguientes reactivos por tubo:

- 600 μ l de muestra: Eluido o plasma (50-100 μ l diluidos en tampón de elución) en duplicado, o estandar (diluido en tampón de elución, en triplicado).

- 100 μ l de primer antisuero (NIAMDD anti-rat prolactin-serum 6 ó 7) diluido 1/1200 en tampón fosfato 0.01 mol/l, EDTA 0.05 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, NaN_3 0.1% pH=7.6, conteniendo un 2% de suero de conejo normal.

- Después de una preincubación de 2-4 horas a temperatura ambiente, se añadían unas 15000 cpm (\sim 10 nCi=370 Bq) de tra-

zador en 100 μ l de tampón fosfosalino (fosfato 0.01 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, NaN_3 0.1%) ovoalbúmina 0.1%, pH=7.6.

- Tras 18-20 horas de incubación a temperatura ambiente, se añadían 200 μ l de segundo antisuero diluido en tampón fosfosalino (fosfato 0.01 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, NaN_3 0.1%, pH=7.6) realizándose una segunda incubación durante 18-20 horas a temperatura ambiente.

- Los tubos se centrifugaban durante 30 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente, eliminándose los sobrenadantes mediante aspiración y contándose el precipitado.

En el primer estudio, donde únicamente se incluían muestras plasmáticas (50-100 μ l), el volumen de dilución de la muestra era menor (200 μ l) y la dilución del primer antisuero mayor (1/2500).

En el caso de análisis de eluidos cromatográficos, cada cromatografía se analizó en una misma tanda, inmediatamente después de terminar la elución.

1.3.5.- Sensibilidad del análisis.-

La cantidad mínima detectable con una confianza del 95% ($p=0.05$) eran 20 - 70 pg del estandar RP-2, por tubo. En el caso de los análisis de eluidos cromatográficos, se determinó la sensibilidad para cada cromatografía, utilizando para ello las fracciones anteriores al volumen de exclusión de la columna.

En el caso del primer estudio, el límite de detección del ensayo era del orden de 100-150 pg del estandar RP-1 por tubo.

1.3.6.- Fiabilidad.-

La variabilidad intraensayo para muestras de plasma

(100 μ l) normoprolactinémicas (1-2 ng RP-2/ml), era del 7-8%, mientras que para muestras hiperprolactinémicas (4-6 ng RP-2/ml), el coeficiente de variación era del 12-15%.

La variabilidad interensayo para valores bajos de rPRL (0.1-0.3 ng RP-2/tubo) era del orden del 5-6%, mientras que para los valores más altos (1-3 ng RP-2/tubo) los coeficientes de variación eran del 16-22%.

1.4.- Determinación de la Creatinina Plasmática.-

Se utilizó el método del picrato alcalino (Doolan y Col., 1969). Se trata de una técnica colorimétrica basada en la formación de un complejo rojo ($\lambda = 520$ nm) de picrato de creatinina, en medio básico, previa desproteinización con ácido túngstico.

2.- ESTUDIO EN HUMANOS.-

2.1.- Selección de individuos.-

Sólamente se incluyeron varones, seleccionándose tres grupos de pacientes con las siguientes características:

- Enfermos con insuficiencia renal crónica, con un aclaramiento de creatinina endógena (C_{cr}) inferior a 40ml/min. (Grupo ICR; n=11; C_{cr} medio \pm DE=16.1 \pm 8.2 ml/min.; rango C_{cr} =7-33 ml/min).

- Pacientes incluidos en programa de hemodiálisis periódica, con un mínimo de tres meses de tratamiento dialítico. (Grupo HDP; n=12; C_{cr} < 5 ml/min.; tiempo en diálisis =4-38 meses).

- Receptores de un injerto renal funcionante con un C_{cr} superior a 50 ml/min., y un tiempo post-transplante superior a tres meses. La dosis máxima de prednisona recibida por estos pacientes fue de 20 mg en días alternos, por vía oral. (Grupo T;

n=11; C_{cr} medio \pm DE=86.3 \pm 18.1 ml/min.; rango de C_{cr} =69-124 ml/min.; tiempo de transplante=5-70 meses).

Como control se incluyó un grupo de varones sanos (Grupo C; n=12; C_{cr} medio \pm DE=126.2 \pm 12.3 ml/min; rango de C_{cr} = 110-145 ml/min).

Los cuatro grupos estudiados eran estadísticamente homogéneos con respecto a la edad ($\bar{x} \pm$ DE, en años): C=35.3 \pm 10.8; IRC=39.4 \pm 11.0; HDP=33.5 \pm 8.4; T=32.3 \pm 7.0. el rango de edad del conjunto era 19-56 años.

Se hizo mucho hincapié en la buena situación general de los pacientes, sin problemas intercurrentes y escasa repercusión sistémica de su enfermedad. No se incluyó en el estudio ningún sujeto portador de una enfermedad crónica de importancia, distinta de la nefropatía, ni que estuviese sometido a tratamiento con drogas capaces de modificar los niveles circulantes de hPRL.

Tanto pacientes como controles fueron informados adecuadamente de la naturaleza de la prueba con anterioridad a su realización, mostrando su conformidad con la misma.

2.2.- Prueba de estímulo de secreción de hPRL por TRH.-

A cada uno de los individuos incluidos en el estudio se les realizó una prueba de estimulación de secreción de prolactina por TRH a dosis máxima. Para ello se colocaba una aguja intravenosa (iv) en el antebrazo izquierdo destinada a la infusión y recogida de muestras. Esta aguja se mantenía permeable utilizando pequeñas cantidades de solución salina isotónica estéril (NaCl 0.15 M). Tras una hora de reposo, se tomaba una muestra de sangre basal, inyectándose a continuación un bolo de 500 μ g de TRH (TRH Pevya). Veinte y 120 minutos después de la inyección de TRH se obtenían dos muestras de sangre venosa, dándose por finalizada la prueba.

En todos los casos, la prueba se realizó por la tarde entre las 15.00 y las 18.00 horas, recomendándose a los sujetos una ingesta alimentaria moderada y temprana. En el caso de los pacientes del grupo HDP, la prueba se realizó en días interdiálisis. En los pacientes transplantados, el estudio se realizó en los días que no tomaban prednisona.

Una vez coaguladas, las sangres se centrifugaban a +4°C, se separaba el suero y se congelaba a -20°C, conservándose a esta temperatura hasta el momento de ser analizado.

2.3.- Estudio emparejado pre/post-transplante renal.-

Cinco individuos que estando en programa de hemodiálisis periódica recibieron un transplante renal que alcanzó adecuada función, fueron estudiados en condiciones basales antes y después de ser transplantados (una vez estabilizada su función renal). Dos de ellos están incluidos en el grupo HDP del presente estudio ya que en su situación pretransplante además de tomarles una muestra basal se les realizó la correspondiente prueba de estímulo de secreción de hPRL por TRH.

En todos los casos las condiciones de toma de muestras fueron idénticas a las descritas anteriormente.

2.4.- Cromatografía de penetrabilidad molecular.-

Se utilizaron columnas de 90 cm x 2.01 cm², empaquetadas con sephadex G-100 (40-120 μ m). Las columnas fueron equilibradas y eluidas con tampón borato 0.1 mol/l, Na₂SO₄ 0.01%, BSA 0.4%, pH=8.4. La elución se realizó por gravedad, a temperatura ambiente, manteniéndose un flujo de 25-30 ml/h. Se aplicaron muestras de 5 ml de suero, recogiendo fracciones de 2 ml.

El calibrado de las columnas se realizó de forma análoga a como se describe en el apartado 1.2.1. de esta misma sección de material y métodos.

2.5.- Determinación de la hPRL.-

El contenido en hPRL de sueros y eluidos cromatográficos se determinó mediante RIA, utilizando un sistema de doble anticuerpo. Los reactivos necesarios para el análisis se obtuvieron de Immuno Nuclear Corporation (Stillwater, Minesota, USA). El porcentaje de reacción cruzada del antisuero con otras hormonas polipeptídicas humanas era:

Hormona del crecimiento (hGH)	<0.01%
Hormona estimulante del tiroides (hTSH)	<0.1%
Hormona luteinizante (hLH)	<0.1%
Hormona estimulante del folículo (hFSH)	<0.1%
Gonadotropina coriónica (hCG)	<0.01%
Lactógeno placentario (hPL)	<0.01%

Los resultados se expresan en unidades de masa de la preparación VLS-2 distribuida por el NIH (National Institute of Health, USA). Un ng de ésta preparación equivale a 30.4 μ IU del estándar de la O.M.S. para inmunoensayos (WHO, IRP 75/504).

La actividad específica del trazador varió entre 55 y 70 μ Ci/ μ g (2.0-2.6 MBq/ μ g).

2.5.1.- Procedimiento analítico.-

Las distintas fracciones de una cromatografía eran analizadas en una misma tanda de RIA, inmediatamente después de terminada la elución.

En el procesamiento habitual de un RIA se añadían los siguientes reactivos por tubo:

- 500 μ l de muestra: Eluido o plasma (50-100 μ l diluidos en tampón de elución) en duplicado, o estándar (diluido en tampón de elución, en triplicado).
- 100 μ l de primer antisuero.

- Después de una hora de preincubación a temperatura ambiente, se añadían unas 15000 cpm ($\sim 10\text{nCi}=370\text{ Bq}$) de trazador en 100 μl de tampón de elución.

- Tras 18-20 horas de incubación a temperatura ambiente, se añadían 300 μl de segundo antisuero diluido en tampón de elución 15% polietilén-glicol 6000, realizándose una incubación de 2 horas a temperatura ambiente.

- Los tubos se centrifugaban durante 30 minutos a 1500 X g a temperatura ambiente, eliminándose los sobrenadantes mediante aspiración y contándose el precipitado.

2.5.2.- Sensibilidad del análisis.-

La cantidad mínima de hPRL detectable se determinó para cada tanda de ensayo; para ello se utilizaban las fracciones anteriores al volumen de exclusión de la columna. El límite de detección medio con una confianza del 95% ($p=0.05$), fué de $223 \pm 27\text{ pg/tubo}$.

2.5.3.- Fiabilidad.-

La variabilidad intraensayo para muestras de suero (100 μl) normoprolactinémicos (9-15 ng/ml), osciló entre el 5-8%, mientras que para muestras hiperprolactinémicas (40-60 ng/ml), el coeficiente de variación era del 6-12%.

La variabilidad interensayo de una mezcla de sueros incluida en las distintas tandas de análisis fué de un 7.1% siendo su valor medio \pm DE de $34.8 \pm 2.5\text{ ng/ml suero}$.

2.5.4.- Análisis de los resultados cromatográficos.-

Analizando el contenido en hPRL inmunorreactiva de las distintas fracciones de una cromatografía, se observaba con cierta frecuencia que la diferenciación de los picos de hPRL grande y hPRL pequeña no era del todo neta. Este problema afectaba especialmente a la evaluación del contenido en hPRL grande

ya que ésta aparecía como un hombro del pico de la hPRL pequeña, habitualmente mucho más abundante.

Para analizar de una forma rigurosa de distribución de la prolactinemia en sus distintos componentes a partir de los datos analíticos, se utilizó un programa que ajustaba los datos experimentales a una curva compleja de tres gaussianas mediante un proceso de minimización de errores, dando el peso ponderal de cada pico y su volumen de elución (K_{av}). Este análisis se pudo realizar gracias a la colaboración de D. Francisco Mingod y Dña. Rosa Vidania, utilizando el ordenador del centro de cálculo de la Junta de Energía Nuclear (UNIVAC 1100/81).

2.6.- Determinación del aclaramiento de creatinina.-

Como medida del grado de función renal (filtración glomerular), a todos los individuos incluidos en los grupos C, IRC y T, se les determinó el aclaramiento de creatinina endógena (C_{cr}), para lo cual recogieron su orina de 24 horas la víspera de la prueba de estímulo con TRH. Para la determinación de la creatinina sérica se utilizó una alícuota de la muestra basal.

La valoración de la creatinina sérica y urinaria se realizó por el método de Doolan y Col. (1969), basado en la formación de un complejo rojo de picrato de creatinina en medio alcalino.

El C_{cr} en ml/min, se calculó de la siguiente manera:

$$C_{cr} = \frac{U \times V}{1440 \times P} \quad , \text{ donde}$$

U = concentración urinaria de creatinina.

P = concentración sérica de creatinina.

V = diuresis / 24 horas en ml.

3.- COMPARACION DE RESULTADOS.-

Para analizar la significación de la variación de un parámetro en un mismo grupo de individuos se utilizó la prueba de Student para datos emparejados. El análisis de significación estadística de las diferencias en un parámetro entre los distintos grupos estudiados se realizó mediante el método de análisis de varianzas.

Los estudios de correlación se realizaron mediante ajustes por mínimos cuadrados. La comparación de pendientes se realizó mediante el análisis de covarianza.

Para la realización de estos cálculos estadísticos, se utilizó una calculadora programable Hewlet-Packard (HP-9815 A), así como los distintos programas estandar que para esta máquina ofrece la misma casa comercial. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Por último cabe señalar que, salvo que se indique lo contrario, los resultados se expresan en forma de media (\bar{x}) \pm error estandar de la media (eem).

RESULTADOS.-

1.- ESTUDIOS EN RATAS.-

Independientemente de las diferencias entre los modelos de uremia (filtración glomerular y/o perfusión renal mantenidos, o nefrectomía bilateral), la creatinina plasmática determinada como control del grado de uremia estaba muy elevada, siendo los valores muy similares entre si (Tabla II).

1.1.- Niveles basales de rPRL en distintos modelos de Uremia aguda en ratas.-

En la figura 2 se representan los valores medios \pm eem de rPRL plasmática de los distintos grupos de ratas estudiados: Controles intactos (C), animales pseudo-operados (SO), ratas con autoinfusión de la orina (AO), binefrectomizadas (NBx) o con ligadura bilateral de uréteres (LBU). Los resultados se expresan en términos de la preparación de referencia RP-1 del NIAMDD.

Tanto los animales con ligadura bilateral de uréteres como los binefrectomizados desarrollaron una hiperprolactinemia importante y del mismo orden, mientras que las ratas con autoinfusión de orina mostraban unos niveles basales de rPRL indistinguibles de los que tenían los controles intactos. Las ratas pseudo-operadas mostraban una prolactinemia basal aumentada respecto a los controles intactos y las ratas con autoinfusión de orina.

TABLA II.-

NIVELES DE CREATININA PLASMATICA (μ mol/l) EN RATAS CON DIFERENTES TIPOS DE UREMIA AGUDA EXPERIMENTAL.-

	SO	C	AO	NBx	LBU
\bar{X}	49.4	37.1	712.5*	776.2*	659.5*
eem	2.1	1.8	70.7	46.9	81.3

* $p < 0.05$ vs C y SO.

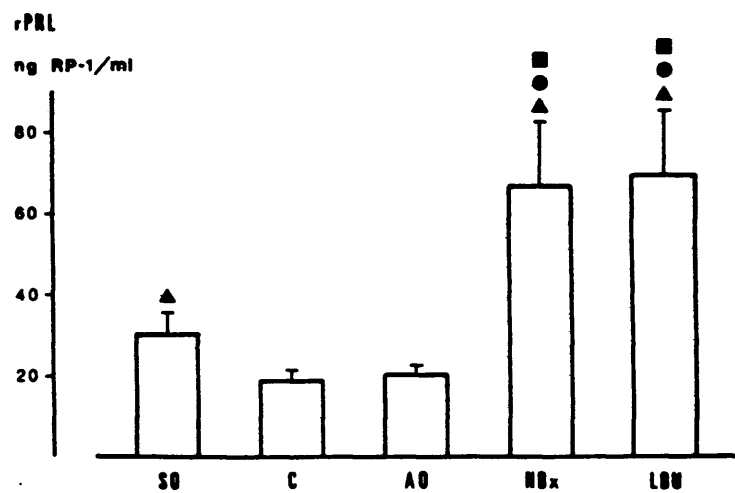


Fig. 2.- Niveles basales de rPRL circulante en ratas con distintos modelos de uremia: SO: pseudo-operadas; C: controles intactos; AO: autoinfusión de orina; NBx: binefrectomizadas; LBU: ligadura bilateral de uréteres. (▲ p < 0.05 vs C; ● p < 0.05 vs SO; ■ p < 0.05 vs AO).

1.2.- Influencia de la orina de rata AO sobre la rPRL plasmática.-

Al incubar "in vitro" plasmas precedentes de animales controles intactos y de ratas binefrectomizadas en presencia de orina de rata AO, en condiciones similares a las que tendrían lugar "in vivo" en el caso de la autoinfusión de orina, no se observó cambio ninguno en los niveles de rPRL inmunorreactiva presente en las muestras (Figura 3).

1.3.- Distribución de la rPRL inmunorreactiva en una cromatografía de exclusión molecular en sephadex G-100, en distintos modelos de Uremia Aguda en ratas.-

1.3.1.- Perfiles de elución.-

En 26 de los 28 plasmas estudiados la rPRL inmunorreactiva se distribuía en dos áreas bien definidas del cromatograma, la primera eluía en el volumen de exclusión de la columna ($K_{av}=0.007 \pm 0.007$) correspondiendo a la rPRL grande-grande. El segundo pico de rPRL eluía con un K_{av} de 0.468 ± 0.018 igual al de la rPRL-I¹²⁵ y que correspondía a la rPRL pequeña (23000 Da).

En la figura 4.A se muestra el perfil de elución de la rPRL inmunorreactiva de una rata del grupo control representativa de la media del grupo. El perfil de elución de las ratas con autoinfusión de orina fué similar al de las ratas controles (Fig. 4.B) si bien en un caso una pequeña cantidad de inmunorreactividad (5.1%) eluyó como rPRL grande ($K_{av}=0.26$) con un peso molecular aparente de unos 54.000 Da.

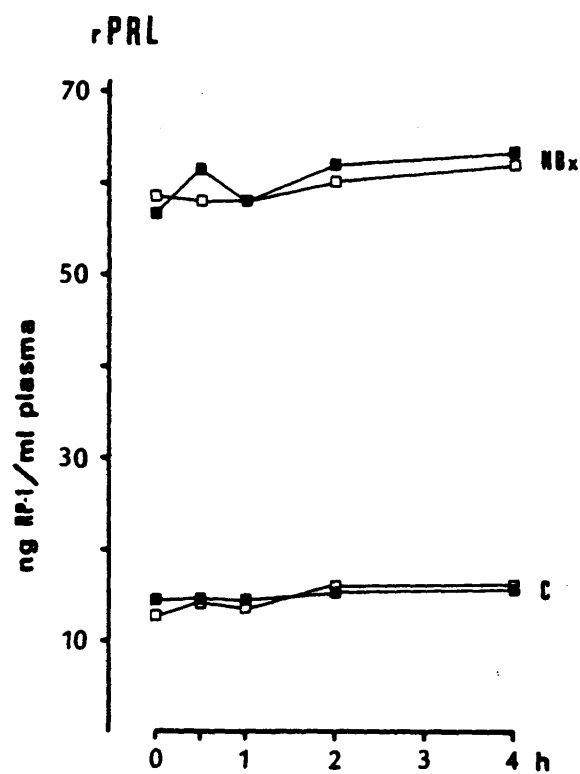


Fig. 3.- Niveles de rPRL inmunorreactiva de dos mezclas de plasmas procedentes de ratas controles (C) y binefrectomizadas (NBx) respectivamente, a lo largo de 4 horas de incubación en presencia de orina de rata con autoinfusión de orina (AO; ■) o de NaCl 10 mmol/l (□).

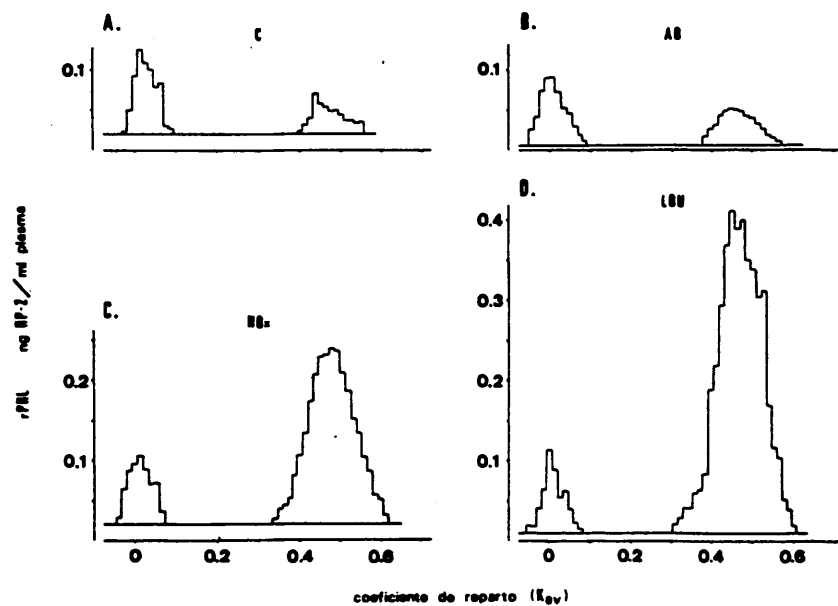


Fig. 4.- Distribución de la rPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de muestras de plasma de ratas con diferentes modelos de uremia aguda experimental:

- A.- Control intacto (C).
- B.- Autoinfusión de orina (AO).
- C.- Nefrectomía bilateral (NBx).
- D.- Ligadura bilateral de uréteres (LBU).

Los perfiles cromatográficos en sephadex G-100 de la rPRL inmunorreactiva presente en los plasmas de las ratas binefrectomizadas o con ligadura bilateral de uréteres fueron similares entre sí pero diferentes de los de las ratas C y AO, mostrando una mayor proporción de rPRL pequeña (Fig. 4.C y D). Como en el caso del grupo AO, una rata binefrectomizada mostró un 4.8% de su inmunorreactividad como rPRL grande ($K_{av}=0.22$; figura 5).

1.3.2.- Distribución cuantitativa.-

La recuperación media de las cromatografías de penetrabilidad molecular fue de 100.3 ± 3.9 de la rPRL inmunorreactiva total aplicada a la columna, variando entre el 71% y el 130%. No se apreciaron diferencias en la recuperación entre los distintos grupos estudiados.

En la tabla III se resumen los resultados obtenidos en los cuatro grupos de ratas: Controles, autoinfusión de orina; ligadura bilateral de uréteres y binefrectomizadas. Los valores de prolactinemia total corresponden a los obtenidos a partir del análisis de los eluidos cromatográficos correspondientes. Como se puede observar, los niveles de rPRL grande-grande no eran significativamente diferentes entre los cuatro grupos de ratas estudiados. Las diferencias en la prolactinemia total se correspondían con el aumento de rPRL pequeña que pasaba de alrededor del 55% en las ratas controles y con AO (rango 14-100%, y 6-71% respectivamente) a cerca del 80% en el caso de los grupos NBx y LBU, donde variaba entre el 64% y el 100%.

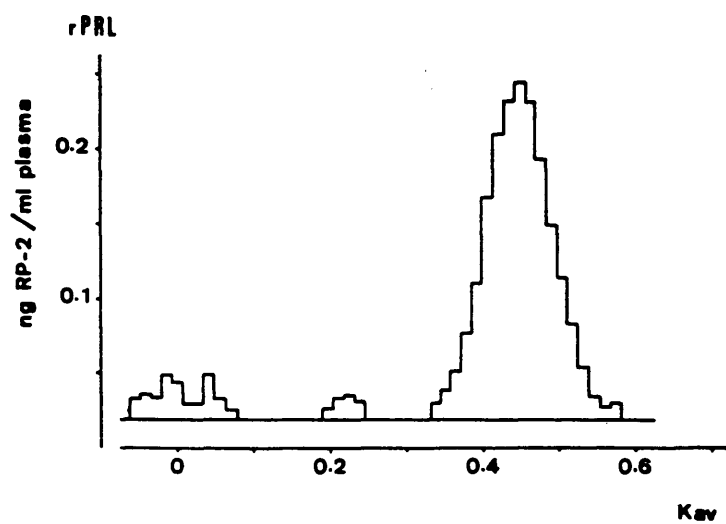


Fig. 5.- Distribución de la rPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de una muestra de plasma de una rata con nefrectomía bilateral (NBx) que mostraba las tres formas moleculares de rPRL: grande-grande, grande y pequeña.

TABLA III.-

NIVELES PLASMATICOS MEDIOS DE rPRL INMUNORREACTIVA (ngRP-2/ml) Y SU DISTRIBUCION
EN RATAS CON DIFERENTES TIPOS DE UREMIA AGUDA EXPERIMENTAL.-

	C	AO	LBU	NBx
TOTAL	1.39 ± 0.27	1.67 ± 0.34	4.64 ± 0.62 *	4.39 ± 0.82 *
GRANDE-GRANDE	0.51 ± 0.07	0.58 ± 0.05	0.88 ± 0.23	0.93 ± 0.33
PEQUEÑA	0.88 ± 0.27	1.07 ± 0.28	3.75 ± 0.73 *	3.44 ± 0.62 *
¶ PEQUEÑA	57.6 ± 7.8	54.7 ± 10.3	78.2 ± 5.3 *	79.6 ± 4.4 *
N	10	6	6	6

* p < 0.05 vs C y AO.

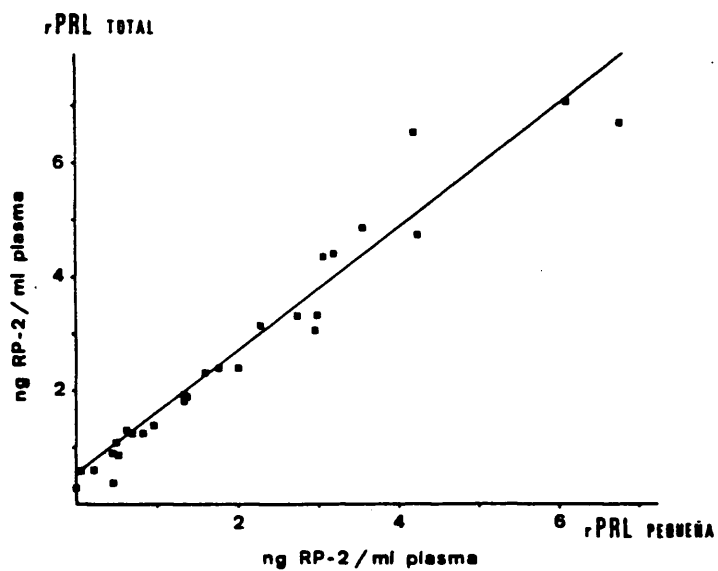


Fig. 6.- Correlación entre los niveles basales de rPRL total y la fracción correspondiente de rPRL pequeña, en las 28 ratas estudiadas.

La figura 6 muestra la relación lineal existente entre los niveles basales de rPRL total y la fracción correspondiente de rPRL pequeña, para las 28 ratas estudiadas. El coeficiente de regresión lineal era de 0.9726, la pendiente no era estadísticamente diferente de 1 ($p > 0.35$), y la ordenada en el origen era indistinguible estadísticamente de la media de los niveles de rPRL grande-grande de todas las ratas estudiadas (0.540, respecto 0.694 ng RP-2/ml; $p > 0.40$).

2.- ESTUDIOS EN HUMANOS: ANALISIS DE LA DISTRIBUCION DE LA rPRL INMUNORREACTIVA CIRCULANTE EN UNA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR EN SEPHADEX G-100, EN DISTINTOS GRUPOS DE ENFERMOS UREMICOS.-

2.1.- Perfiles de elución.-

Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran respectivamente los perfiles cromatográficos en sephadex G-100 de la hPRL inmunorreactiva presente en un individuo control (C), un paciente con insuficiencia renal crónica (IRC), un enfermo de programa de hemodiálisis periódica (HDP) y un paciente con un trasplante renal funcionante (T). En cada caso se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes tanto al suero basal como de aquellos obtenidos a los 20 y 120 minutos de un estímulo agudo con TRH.

En los distintos grupos y en las distintas circunstancias estudiadas se detectaron las tres formas de hPRL descritas: la hPRL grande-grande, que eluía muy próxima al volumen de exclusión de la columna ($K_{av}=0.038 \pm 0.006$), la hPRL grande con un K_{av} de 0.232 ± 0.004 , y la hPRL pequeña que eluía con un K_{av} de 0.401 ± 0.004 .

No en todos los casos se detectó la presencia de las hPRL grande y grande-grande. La no detección de la forma grande fue un fenómeno extemporáneo, no apreciándose diferencias entre los distintos grupos en cuanto a su incidencia. En el caso de la

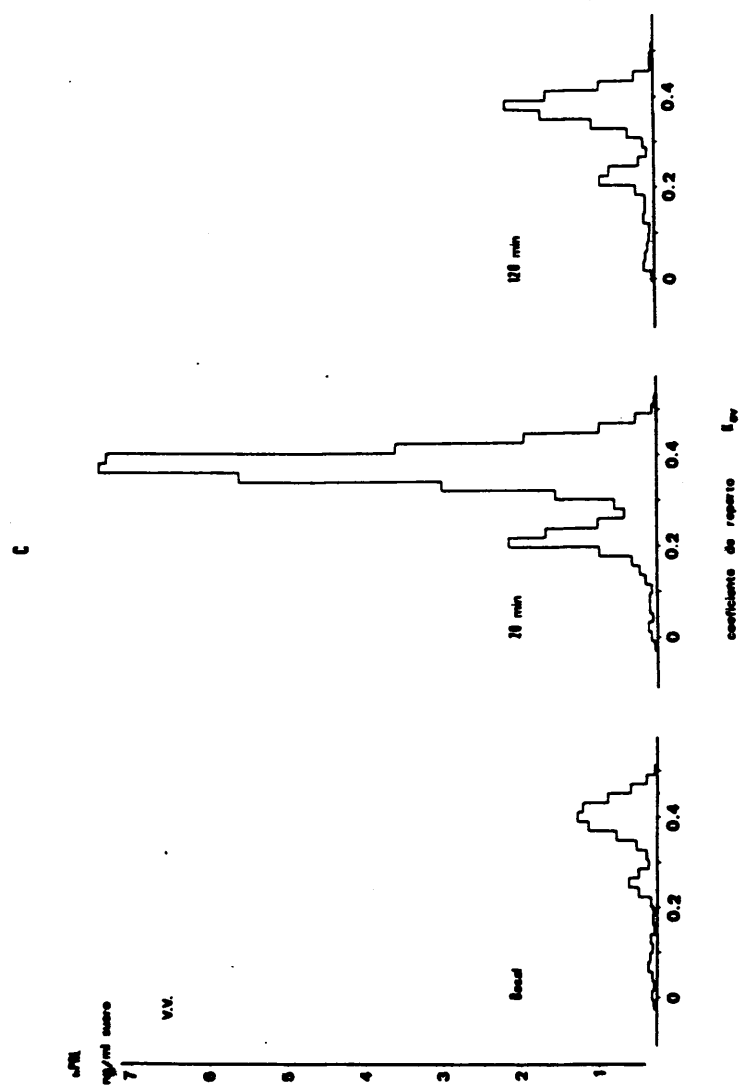


Fig. 7.- Perfil cromatográfico de la hPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de muestras de suero obtenidas en condiciones basales y a los 20 y 120 minutos de un bolo iv de TRH, en un individuo control.

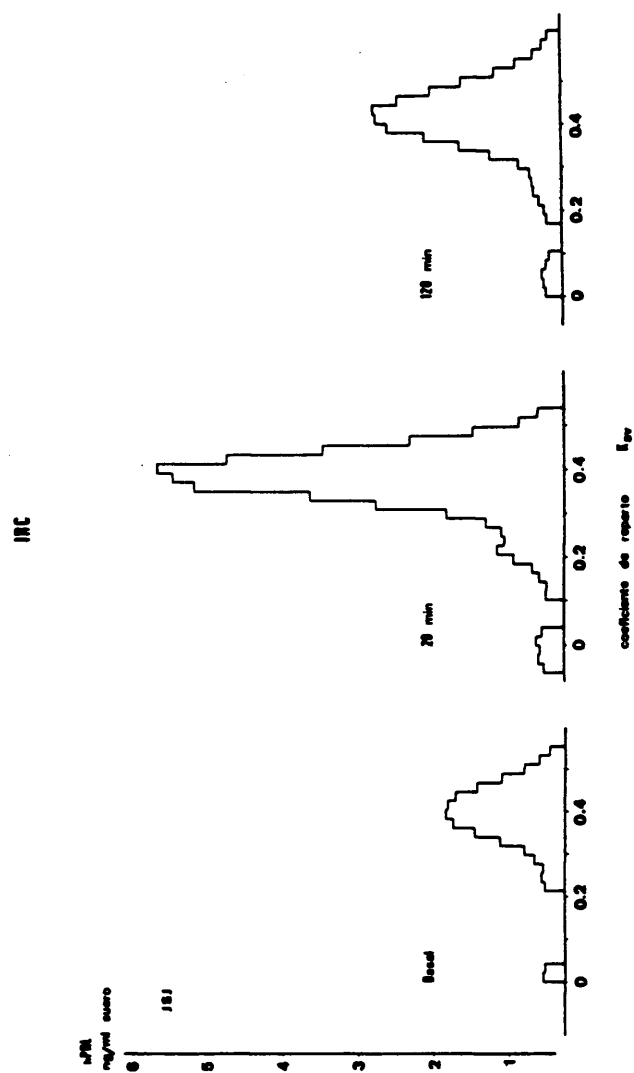


Fig. 8.- Perfil cromatográfico de la hPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de muestras de suero obtenidas en condiciones basales y a los 20 y 120 minutos de un bolo iv de TRH, en un enfermo con IRC.

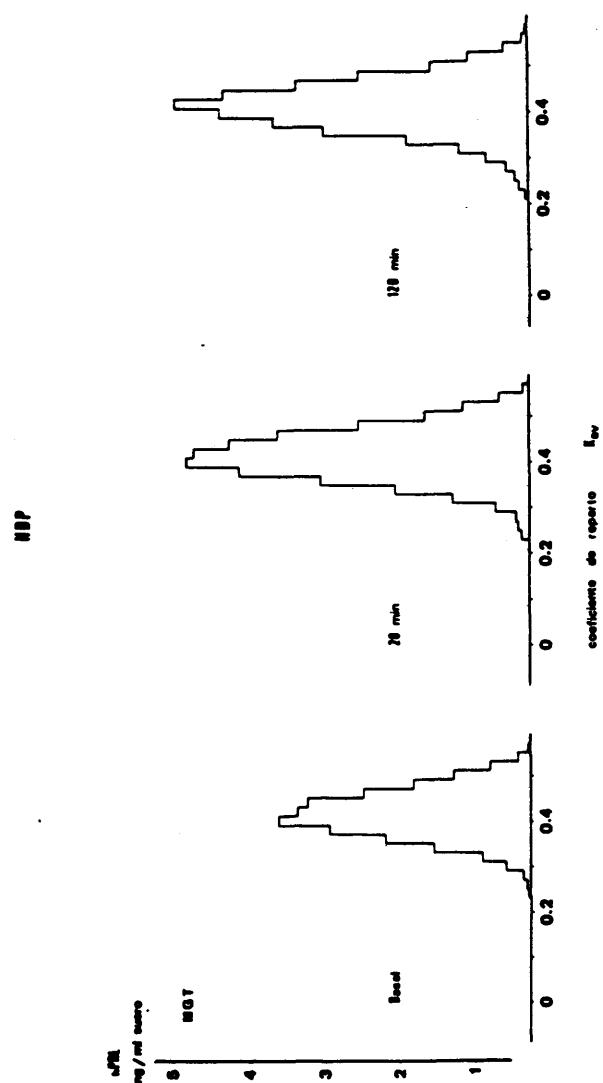


Fig. 9.- Perfil cromatográfico de la hPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de muestras de suero obtenidas en condiciones basales y a los 20 y 120 minutos de un bolo iv de TRH, en un enfermo en HDP.

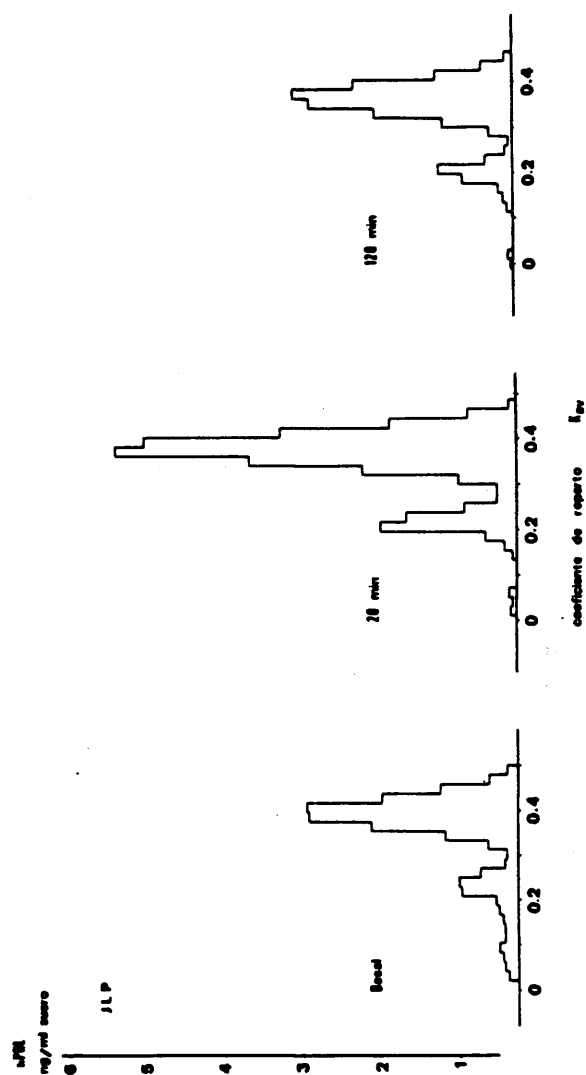


Fig. 10.- Perfil cromatográfico de la hPRL inmunorreactiva en sephadex G-100 de muestras de suero obtenidas en condiciones basales y a los 20 y 120 minutos de un bolo iv de TRH, en un individuo con un transplante renal funcionando.

hPRL grande-grande, su no detección fue un fenómeno más frecuente, especialmente en el caso del grupo HDP en el que la frecuencia de no detección de hPRL grande-grande fue muy importante y significativamente mayor que en el resto de los grupos. Esta diferencia se apreciaba tanto en las muestras basales como en las obtenidas 20 y 120 minutos después del estímulo de secreción con TRH.

2.2.- Distribución en condiciones basales.-

En la figura 11 se representan los valores medios (\pm eem) de hPRL sérica total y su distribución cromatográfica en sephadex G-100 de cada uno de los grupos estudiados, en condiciones basales. Comparando los distintos grupos, la prolactinemia media basal estaba aumentada tanto en el grupo IRC como en el HDP respecto al grupo control, siendo los valores de hPRL total del grupo HDP mayores que los del grupo de enfermos que mantenían un cierto grado de función renal. Estos resultados se correspondían con el hecho de que considerando como rango de normalidad de la prolactinemia el valor medio $\pm 2x$ DE del grupo control (3.90 - 20.2 ng/ml), sólo 2 de los enfermos con IRC (18%) presentaban hiperprolactinemia basal frente al 75% de los pacientes en HDP (9 de 12). Por su parte, 3 de los individuos transplantados tenían una prolactinemia basal en el límite superior de la normalidad, siendo la prolactinemia media del grupo, estadísticamente indistinguible de la del grupo control.

Analizadas cada una de las formas de hPRL por separado, se observó que las diferencias en los niveles de prolactinemia total se correspondían con las de la forma pequeña, no apreciándose diferencias importantes en las formas de alto peso molecular. Los niveles de hPRL grande-grande eran indistinguibles estadísticamente en los cuatro grupos, y sólo en el grupo HDP se apreciaron unos niveles de hPRL grande estadísticamente menores que las del grupo control, si bien esta diferencia era muy pequeña en valor absoluto. En el caso del grupo HDP, únicamente en 4 de los 12 individuos estudiados se detectó hPRL grande-grande.

BASAL

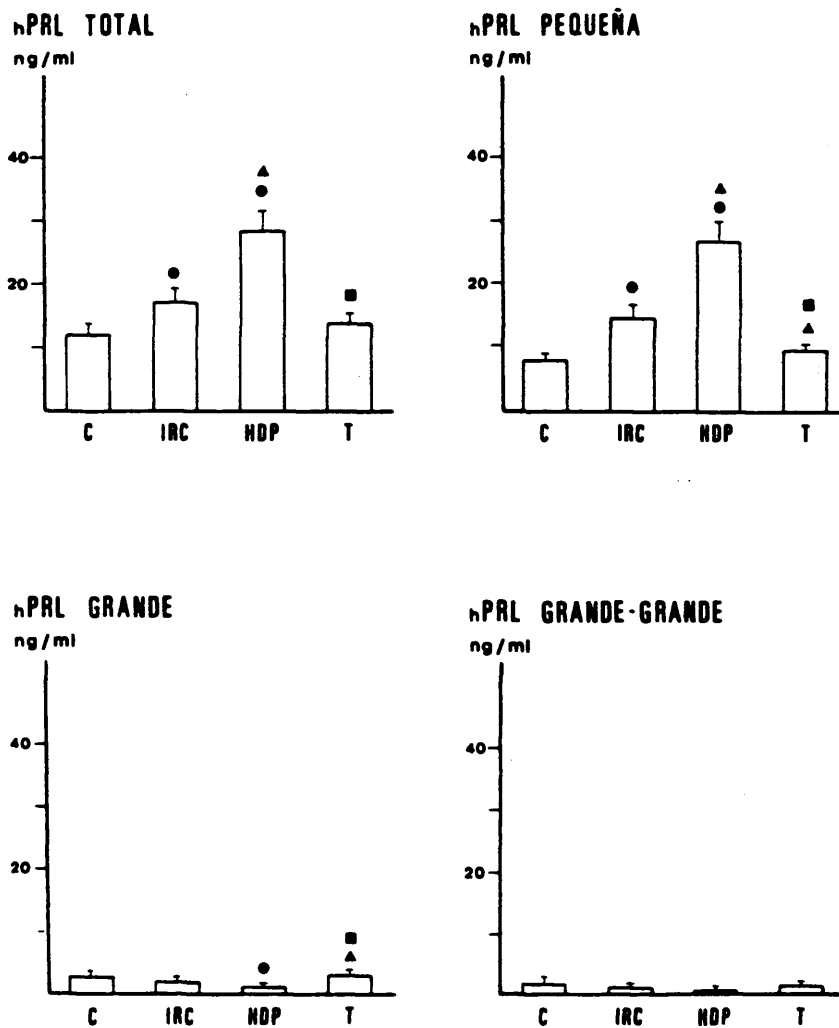


Fig. 11.- Niveles basales de hPRL inmunorreactiva encada uno de los grupos estudiados. ● $p < 0.05$ vs grupo C. ▲ $p < 0.05$ vs grupo IRC. ■ $p < 0.05$ vs grupo HDP.

2.3.- Distribución a los 20 minutos del estímulo agudo con TRH.-

En la figura 12 se representan los valores medios (\pm eem) de hPRL sérica total y su distribución cromatográfica en sephadex G-100 de cada uno de los grupos estudiados, a los 20 minutos del bolo intravenoso de TRH.

Tanto los niveles de hPRL total como los de hPRL pequeña fueron indistinguibles entre los cuatro grupos estudiados. Por lo que a las hPRLs grande y grande-grande se refería, mientras que las cifras obtenidas para el grupo T eran indistinguibles de las del grupo control, los grupos IRC y HDP mostraban unos niveles significativamente menores. En el caso del grupo HDP, únicamente en 6 de los 12 individuos estudiados se detectó hPRL grande-grande.

2.4.- Distribución a los 120 minutos del estímulo agudo con TRH.

En la figura 13 se representan los valores medios (\pm eem) de prolactinemia y su distribución cromatográfica en sephadex G-100 de cada uno de los grupos estudiados, a los 120 minutos del bolo intravenoso de TRH.

A los 120 minutos del estímulo agudo con TRH la situación de conjunto era muy parecida a la basal (Fig. 10). Tanto el grupo IRC como el HDP presentaban hiperprolactinemia siendo significativamente mayor en el segundo caso. En cuanto a la hPRL pequeña se refiere, los resultados eran prácticamente comparables a los de la hPRL total, si bien en este caso sí se apreciaba una ligera hiperprolactinemia de esta forma molecular en el grupo T respecto al grupo control.

En cuanto a la hPRL grande, los niveles de esta forma molecular en el grupo HDP eran menores que en el grupo control. Por su parte el grupo T presentaba unos niveles de hPRL grande superiores a los de los grupos IRC y HDP, pero indistinguibles de los valores del grupo C.

20 min

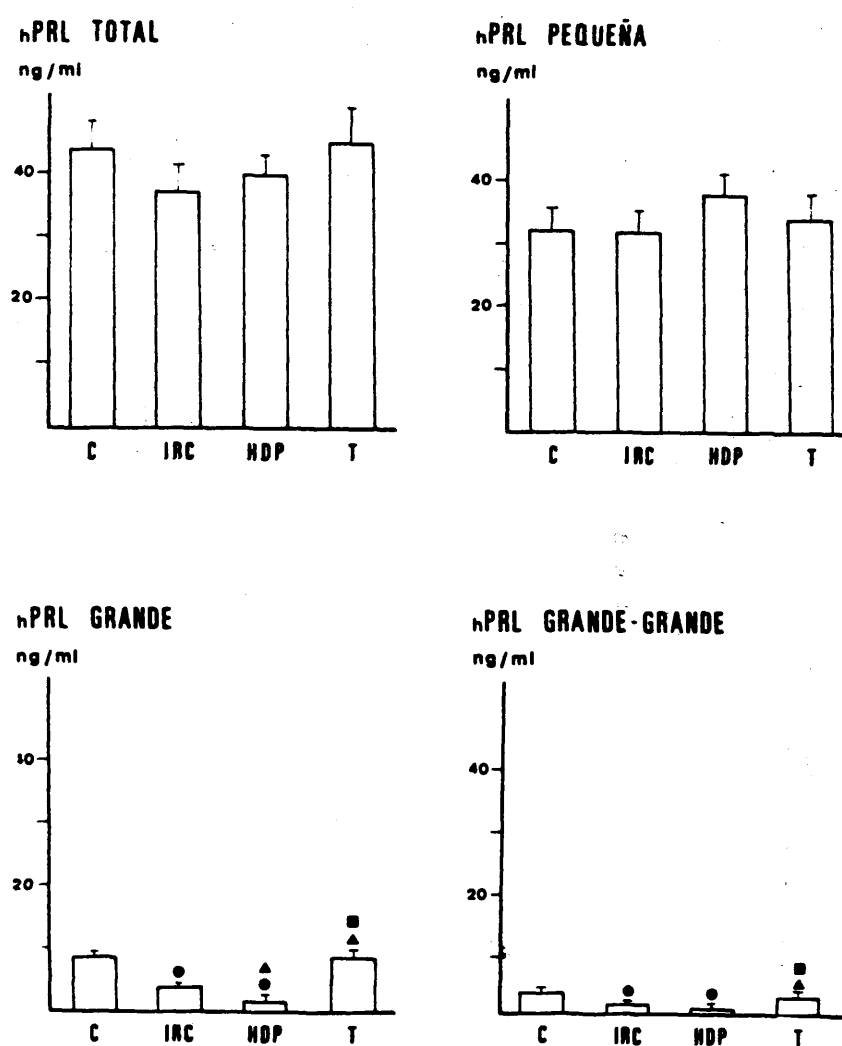
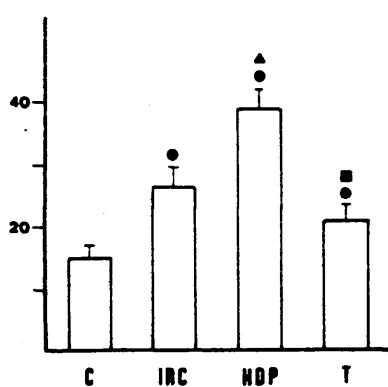


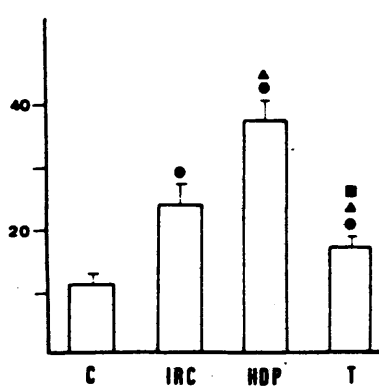
Fig. 12.- Niveles de hPRL inmunorreactiva a los 20 minutos del estímulo de secreción con TRH, en los distintos grupos estudiados. ● p < 0.05 vs grupo C. ▲ p < 0.05 vs grupo IRC. ■ p < 0.05 vs grupo HDP.

120 min

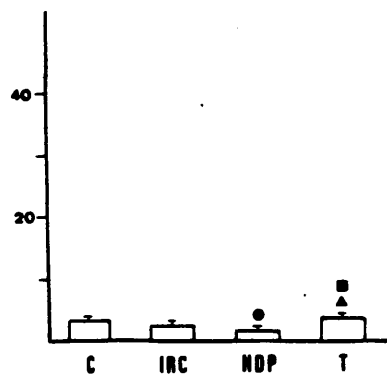
hPRL TOTAL
ng/ml



hPRL PEQUEÑA
ng/ml



hPRL GRANDE
ng/ml



hPRL GRANDE-GRANDE
ng/ml

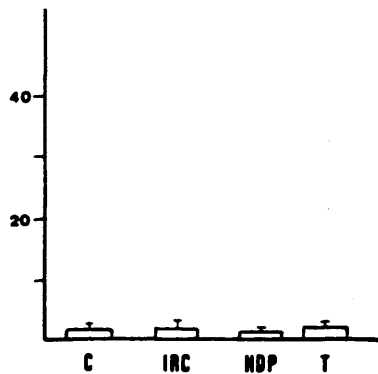


Fig. 13.- Niveles de hPRL inmunorreactiva a los 120 minutos del estímulo de secreción con TRH, en los distintos grupos estudiados. ● p < 0.05 vs grupo C. ▲ p < 0.05 vs grupo IRC. ■ p < 0.05 vs grupo HDP.

En lo que a la hPRL grande-grande se refiere, sus niveles eran indistinguibles en los cuatro grupos estudiados. En el grupo HDP esta forma de hPRL sólo fue detectada en 4 de los 12 individuos estudiados.

2.5.- Análisis de la respuesta al estímulo agudo con TRH.-

En la tabla IV se resumen los datos recogidos en las figuras 10-12. Estos mismos resultados se muestran gráficamente en la figura 14 de forma que se representa la evolución tanto de la prolactinemia total como de sus componentes separables en sephadex G-100 durante la prueba de estímulo con TRH, para los cuatro grupos estudiados (C, IRC, HDP y T).

En los individuos controles, 20 minutos después del estímulo agudo con TRH se observaba un aumento de los tres componentes de hPRL analizados, recuperándose los valores basales a los 120 minutos con excepción de la hPRL pequeña que permanecía ligera pero significativamente aumentada.

En el grupo IRC, a los 20 minutos de la estimulación con TRH se observó un aumento de los niveles circulantes de hPRL pequeña y grande, no afectándose significativamente los valores de hPRL grande-grande respecto de las cifras basales. A los 120 minutos del estímulo, tanto la prolactinemia total como los niveles circulantes de los distintos componentes analizados habían disminuido respecto a los valores a los 20 minutos. Sin embargo, en relación a los niveles basales, la prolactinemia total y las cifras de hPRL pequeña y grande permanecían elevadas.

En los pacientes en programa de hemodiálisis, a los 20 minutos del estímulo agudo con TRH, se apreciaba un aumento significativo de los niveles de hPRL total debido a un aumento de las formas pequeña y grande, no apreciándose variaciones significativas en la hPRL grande-grande. A los 120 minutos del estímulo la situación era idéntica a la de los 20 minutos.

TABLA IV

NIVELES SERICOS MEDIOS ($\bar{x} \pm \text{EEM}$) DE hPRL INMUNORREACTIVA (ng/ml) Y SU DISTRIBUCION EN INDIVIDUOS CON DIFERENTES GRADOS DE FUNCION RENAL EN CONDICIONES BASALES Y DESPUES DE UN ESTIMULO AGUDO CON TRIH (20 Y 120 MINUTOS)

GRUPO	T	GRANDE-GRANDE	GRANDE	PEQUEÑA	TOTAL
C	Basal	1.64 \pm 0.39	2.48 \pm 0.41	7.94 \pm 0.87	12.06 \pm 1.18
	20 min.	3.43 \pm 0.85 \star	9.03 \pm 0.92 \star	32.32 \pm 3.39 \star	44.77 \pm 4.16 \star
	120 min.	1.18 \pm 0.28 Δ	3.17 \pm 0.48 Δ	10.45 \pm 1.29 $\star\Delta$	14.81 \pm 1.76 Δ
IRC	Basal	1.18 \pm 0.39	1.62 \pm 0.39	14.58 \pm 1.78 \bullet	17.37 \pm 2.22 \bullet
	20 min.	1.63 \pm 0.48 \bullet	4.02 \pm 0.54 \star	31.96 \pm 3.70 \star	37.59 \pm 4.38 \star
	120 min.	0.86 \pm 0.33 Δ	2.39 \pm 0.46 $\star\Delta$	23.01 \pm 3.03 $\bullet\star\Delta$	26.25 \pm 3.50 $\bullet\star\Delta$
HDP	Basal	0.52 \pm 0.24	1.04 \pm 0.28 \bullet	27.00 \pm 3.11 $\bullet\Delta$	28.55 \pm 3.32 $\bullet\Delta$
	20 min.	0.80 \pm 0.28 \bullet	1.62 \pm 0.39 $\bullet\Delta$	37.67 \pm 3.20 \star	40.15 \pm 3.26 \star
	120 min.	0.72 \pm 0.39	1.65 \pm 0.24 $\bullet\star$	36.18 \pm 3.26 $\bullet\Delta\star$	38.55 \pm 3.21 $\bullet\Delta\star$
T	Basal	1.60 \pm 0.42	2.79 \pm 0.38 Δ	9.62 \pm 1.29 Δ	14.01 \pm 1.63 Δ
	20 min.	2.96 \pm 0.55 $\Delta\star$	9.06 \pm 1.29 $\Delta\star$	33.81 \pm 3.86 \star	45.83 \pm 5.22 \star
	120 min.	1.44 \pm 0.37 Δ	3.92 \pm 0.57 $\Delta\Delta$	16.08 \pm 1.54 $\bullet\Delta\star\Delta$	21.16 \pm 2.00 $\bullet\Delta\star\Delta$

C. controles; IRC, insuficiencia renal crónica; HDP, hemodiálisis periódica; T, transplantados.

$\star p < 0.05$ vs basal; $\Delta p < 0.05$ vs 20 min.

$\bullet p < 0.05$ vs C; $\Delta p < 0.05$ vs IRC; $\Delta\star p < 0.05$ vs HDP.

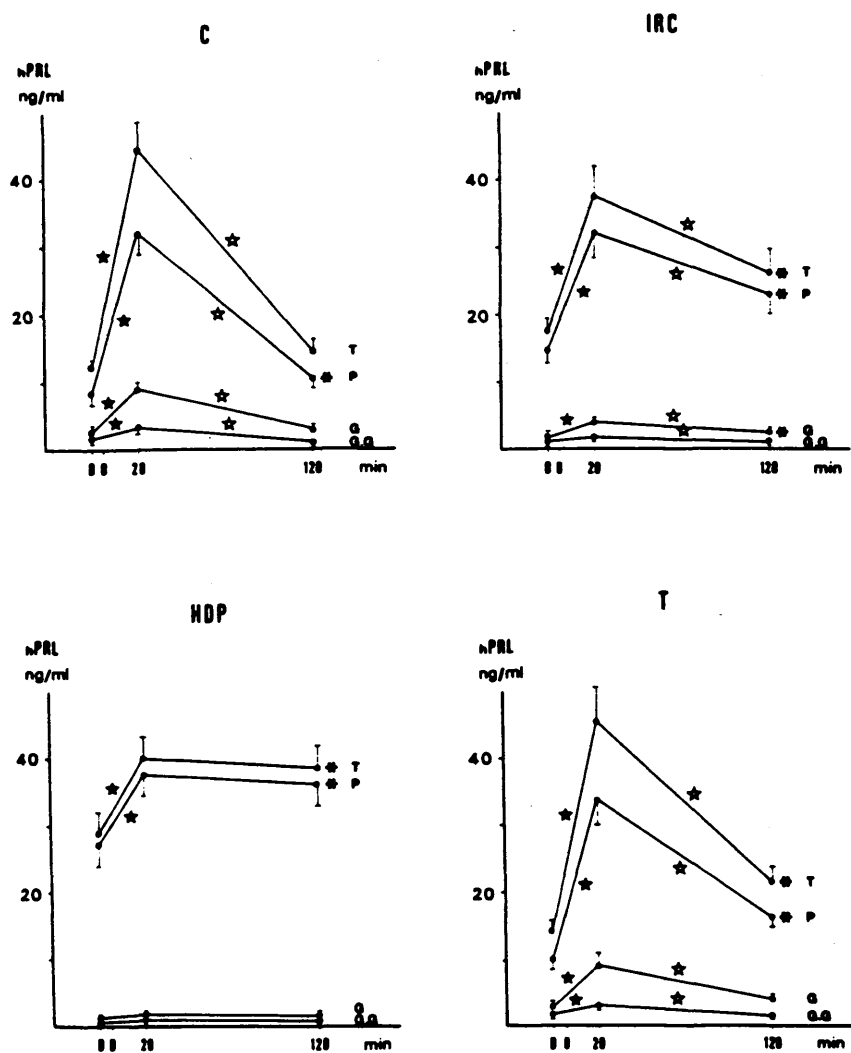


Fig. 14.- Variaciones en la prolactinemia tras el estímulo agudo con TRH, en los distintos grupos estudiados. (★, ☆ $p < 0.05$; • $p < 0.05$ vs situación basal).

En el caso de los individuos portadores de un transplante renal funcionante, se observó una respuesta a la TRH similar a la del grupo control. Sin embargo a los 120 minutos del estímulo, los niveles de hPRL total, además de los de su componente pequeña, permanecían discreta pero significativamente elevados respecto a los valores basales.

2.5.1.- Análisis de las variaciones en la prolactinemia entre la situación basal y los 20 minutos tras el estímulo agudo con TRH.-

En la Tabla V se recogen los incrementos medios de hPRL total y de sus distintas variantes analizadas, entre la situación basal y 20 minutos después del bolo intravenoso de TRH (Δ_{0-20}), para los cuatro grupos estudiados. Los resultados se expresan tanto en valor absoluto (ng/ml) como relativo (% de incremento respecto al valor basal).

Al estudiar la contribución de las distintas variantes de hPRL estudiadas al Δ_{0-20} de la prolactinemia total tanto en el caso de la hPRL pequeña como en el de la hPRL grande se apreciaron sendas correlaciones lineales entre el incremento de la hPRL total y la contribución al mismo de la variante de hPRL correspondiente, para la totalidad de individuos estudiados (figura 15). La pendiente, para la hPRL pequeña era de 0.751 ($r=0.9625$), y para la hPRL grande 0.202 ($r=0.8321$). No se apreciaron diferencias en la relación de incrementos netos de hPRL-pequeña/hPRL-grande entre los distintos grupos estudiados.

2.5.2.- Análisis de las variaciones en la prolactinemia entre los 20 y 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.

Para estudiar la disminución tanto de la prolactinemia total como de sus distintos componentes analizados, entre los 20 y 120 minutos después del estímulo de secreción con TRH, se definió como "índice de Desaparición" o ID a la relación entre el correspondiente decremento neto en los niveles circulantes

TABLA V

INCREMENTO ABSOLUTO (ng/ml) Y RELATIVOS (%) RESPECTO AL VALOR BASAL) DE LA PROLACTINEMIA ENTRE LA SITUACION BASAL Y 20 MINUTOS DESPUES DEL ESTIMULO AGUDO CON TRH
(Δ_{0-20})

GRUPO	GRANDE-GRANDE	GRANDE	PEQUEÑA	TOTAL
C	ng/ml 1.87 ± 0.57	6.55 ± 0.81	24.38 ± 3.22	32.71 ± 4.72
	% 117.30 ± 51.50	283.50 ± 46.80	341.60 ± 51.80	299.00 ± 43.40
IRC	ng/ml 0.78 ± 0.23	2.40 ± 0.33●	17.38 ± 2.99	20.21 ± 3.30●
	% 66.70 ± 24.00	214.00 ± 53.20	128.40 ± 21.90	125.70 ± 19.50●
HDP	ng/ml 0.52 ± 0.25	0.88 ± 0.33●	10.99 ± 2.81●	12.23 ± 2.66●
	% 25.80 ± 11.40	233.60 ± 152.30	59.60 ± 23.00■	59.60 ± 18.90■
T	ng/ml 1.59 ± 0.50	6.27 ± 1.25▲	24.19 ± 3.29▲	31.82 ± 4.580▲
	% 78.40 ± 24.60	292.20 ± 66.10	289.70 ± 45.50▲	252.00 ± 37.40▲

● p < 0.05 vs grupo C.

■ p < 0.05 vs grupo IRC.

▲ p < 0.05 vs grupo HDP.

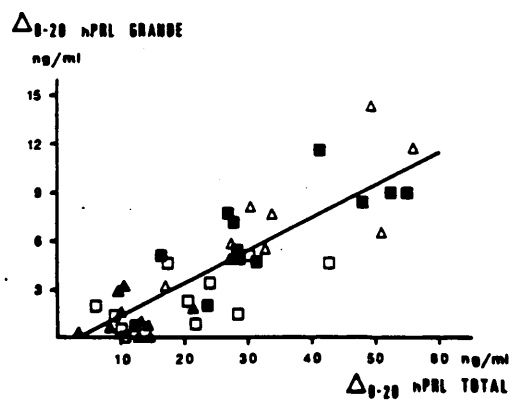
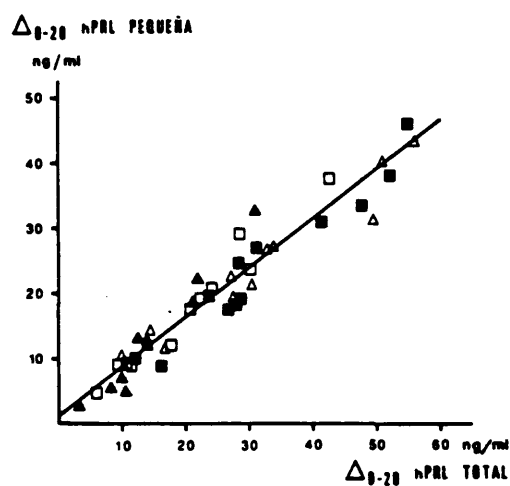


Fig. 15.- Correlación entre el incremento de la prolactinemia total entre la situación basal y 20 minutos después del bolo iv de TRH (Δ_{0-20} hPRL total) y la contribución al mismo de la hPRL pequeña (Δ_{0-20} hPRL pequeña; panel superior) y la hPRL grande (Δ_{0-20} hPRL grande; panel inferior) para el conjunto de individuos estudiados (■ Controles; □ IRC; ▲ HDP; △ Transplantados)

(Δ_{20-120}) y los niveles séricos a los 20 minutos:

$$ID = \Delta_{20-120} / hPRL_{20}$$

En la figura 16 se representan los valores medios (\pm eem) de ID obtenidos para la hPRL pequeña. Ambos resultados fueron prácticamente superponibles para cada uno de los grupos estudiados. En los tres grupos de pacientes, estos valores de ID eran menores que los observados en el grupo control, existiendo diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados.

En el caso de las hPRL grande y grande-grande, no era posible calcular el ID en todos los casos debido a que los niveles circulantes de estas fracciones de hPRL o bien eran idetectables o bien eran muy bajos, estando muy afectados por errores metodológicos (valores próximos al límite de detección, ajuste de los análisis cromatográficos, diferencias en la recuperación de las cromatografías de las muestras obtenidas a los 20 y 120 minutos del estímulo agudo con TRH). Sólo se calculó el ID en aquellos casos en que, para la fracción de hPRL correspondiente, se cumplían los dos criterios siguientes:

- a) Apreciarse una estimulación neta en la respuesta a la TRH ($\Delta_{0-20} > 0$).
- b) Los niveles a los 20 minutos del bolo iv de TRH fueran mayores o iguales a 3 ng/ml.

En la tabla VI se resumen los valores obtenidos para la hPRL grande en cada uno de los grupos estudiados, no apreciándose diferencias significativas entre los distintos grupos. Es interesante destacar que los valores de ID obtenidos para la hPRL grande eran indistinguibles de los obtenidos para la hPRL total y hPRL pequeña en el grupo control. Analizada la correlación entre el Δ_{20-120} y el valor de $hPRL_{20}$ para la hPRL grande, considerando el conjunto de 30 individuos que cumplían los criterios citados más arriba, los resultados se ajustaban a una recta de pendiente 0.735 con un coeficiente de regresión lineal de 0.9082 (figura 17).

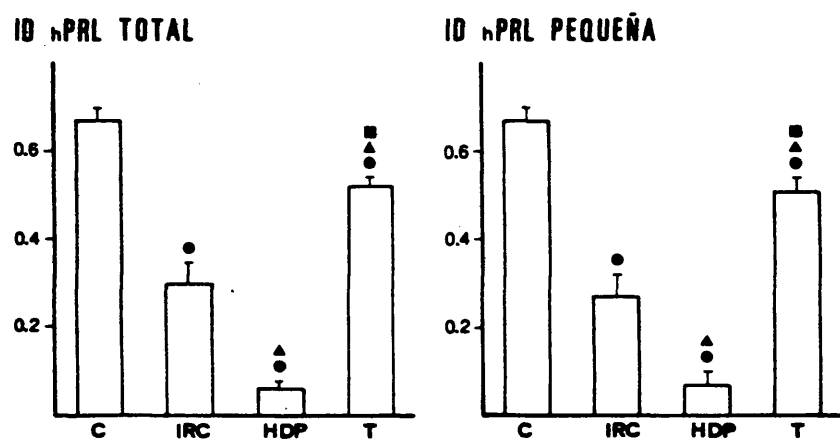


Fig. 16.- Valores del "Indice de Desaparición" (ID) obtenidos para la hPRL total y la hPRL pequeña en cada uno de los grupos estudiados. ($ID = \Delta_{20-120}/hPRL_{20}$).
 ● $p < 0.05$ vs grupo C. ▲ $p < 0.05$ vs grupo IRC.
 ■ $p < 0.05$ vs grupo HDP.

TABLA VI

VALORES DEL "INDICE DE DESAPARICION" (ID)* OBTENIDOS PARA LA
hPRL GRANDE EN LOS DISTINTOS GRUPOS ESTUDIADOS**

GRUPO	C	T	IRC	HDP	CONJUNTO
\bar{X}	0.64	0.59	0.64	0.49	0.61
ED	0.20	0.20	0.19	0.12	0.19
EEM	0.06	0.07	0.08	0.08	0.04
N	12	9	6	3	30

* $ID = \Delta_{20-120}/hPRL_{20}$

** Solo se calculó en los casos en que se cumplía:

a) $\Delta_{0-20} > 0$, y

b) $hPRL-grande_{20} \geq 3$ ng/ml.

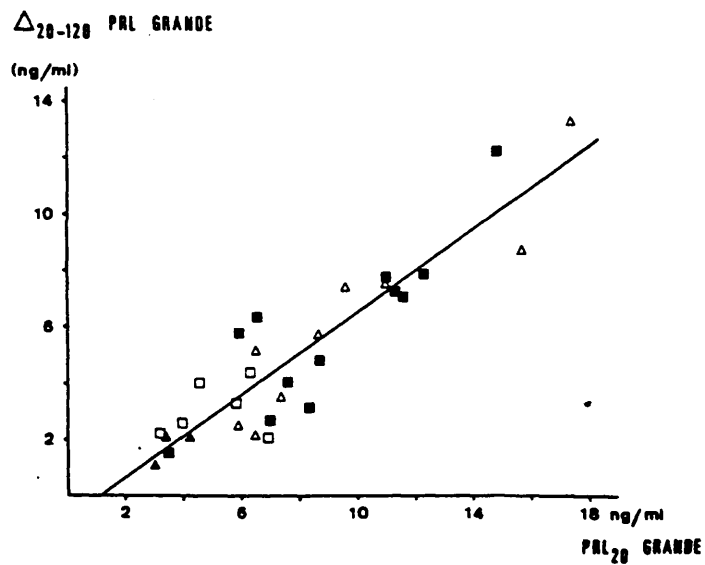


Fig. 17.- Correlación entre el Δ_{20-120} y el valor de $hPRL_{20}$ para la $hPRL$ grande, para el conjunto de individuos que cumplían: a) $\Delta_{0-20} > 0$, y b) $hPRL_{20} \geq 3$ ng/ml.
 ■ Controles; □ IRC; ▲ HDP; △ Transplantados.

En el caso de la hPRL grande-grande los resultados obtenidos no permitieron un análisis estadístico serio. Ninguno de los pacientes del grupo HDP cumplía los requisitos mínimos y en sólo dos enfermos con IRC era posible calcular el ID para esta variante de hPRL. En el caso del grupo control el ID obtenido para la hPRL grande-grande fue de 0.70 ± 0.07 (n=7), este valor era indistinguible de los obtenidos en este mismo grupo para las hPRLs total, pequeña y grande.

2.5.3.- Relación del ID con el grado de función renal.-

El aclaramiento de creatinina (C_{cr}) medio del grupo control era de 126.2 ± 3.9 ml/min. En el caso de los individuos en programa de hemodiálisis no anéfricos no se determinó su aclaramiento de creatinina residual, pero en todo caso era inferior a 5 ml/min. Por su parte los grupos IRC y T eran grupos heterogéneos en cuanto a su grado de función renal, en el caso del grupo IRC el C_{cr} variaba entre 7 y 33 ml/min., mientras que entre los transplantados el rango era de 69-124 ml/min.

Observando la figura 16 se podía intuir una cierta relación entre los valores de ID para la hPRL total y hPRL pequeña y el grado de función renal, ya que este valor disminuía respecto a los controles en el grupo T, era aún menor en el grupo IRC, y se hacía estadísticamente indistinguible de cero en los enfermos en diálisis. Si estas diferencias eran efectivamente dependientes del grado de función renal, debería apreciarse una correlación entre los datos individuales de C_{cr} e ID al analizar los resultados de los grupos IRC y T. Efectivamente, analizados estos datos, se observó que tanto en el caso de hPRL total como de la hPRL pequeña, existía una clara correlación de tipo logarítmico entre los valores de ID y el correspondiente de C_{cr} (Fig. 18). En el caso de la hPRL total, los datos se ajustaban a la ecuación:

$$ID \text{ (hPRL total)} = 0.158 \times \ln C_{cr} \text{ (ml/min)} - 0.132$$

siendo el valor de $r = 0.8771$. Por su parte, la ecuación obtenida para la hPRL pequeña fué:

$ID \text{ (hPRL pequeña)} = 0.153 \times \ln C_{cr} \text{ (ml/min)} - 0.155$
siendo $r = 0.8781$

2.6.- Estudio emparejado pre/post-transplante renal de la prolactinemia basal.-

En la figura 19 se muestra la evolución tanto de la prolactinemia total como de sus componentes separables en sephadex G-100, en condiciones basales en un grupo de cinco individuos que estando en programa de hemodiálisis periódica recibieron un transplante renal funcionando. Tras el injerto renal se observó una caída de la prolactinemia total del orden del 50%, correspondiente a una disminución aún más importante de los niveles de hPRL pequeña, apreciándose un aumento, ligero pero significativo, de las hPRLs grande y grande-grande. Los valores medios del grupo antes y después del transplante fueron indistinguibles de los obtenidos para los grupos HDP y T respectivamente.

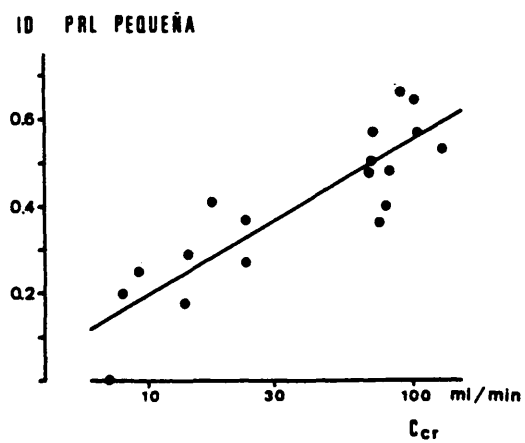
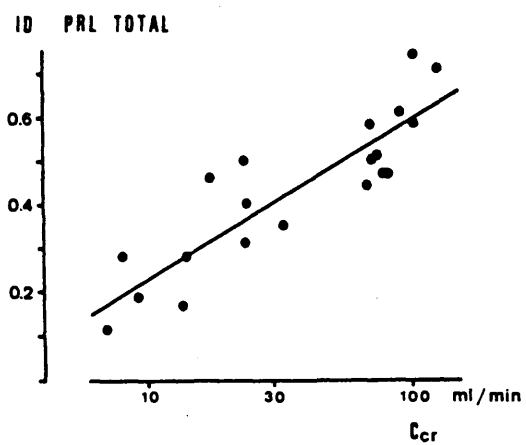


Fig. 18.- Correlación entre el "Índice de Desaparición" (ID) de la hPRL total (panel superior) y de la hPRL pequeña (panel inferior) con el grado de función renal (C_{cr}) en los individuos de los grupos IRC y T. ($ID = \Delta_{20-120} / hPRL_{20}$).

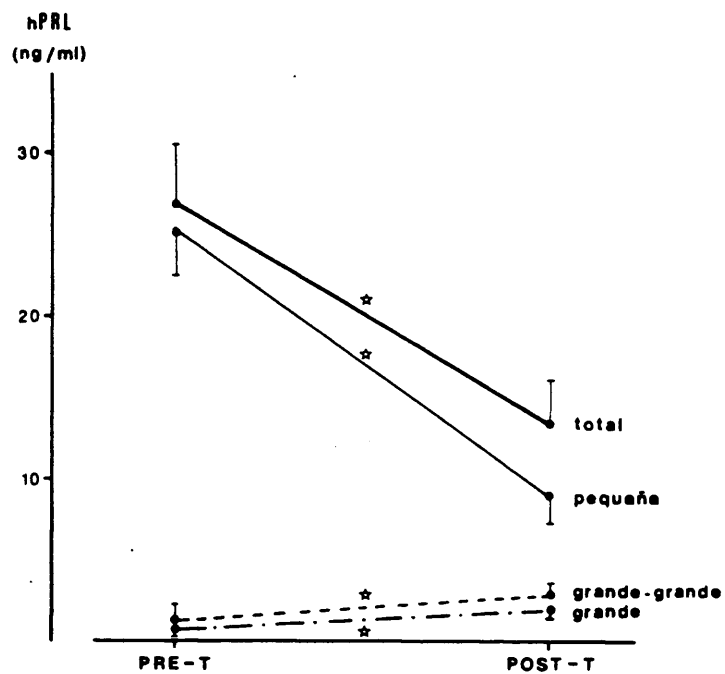


Fig. 19.- Variaciones de la prolactinemia total y de sus distintos componentes, en condiciones basales, pre- y post-transplante, en un grupo de enfermos en HDP que recibieron un transplante renal funcionante. $\star p < 0.05$.

DISCUSSION.-

1.- HIPERPROLACTINEMIA EN LA UREMIA AGUDA EXPERIMENTAL.-

El primer objetivo era intentar clarificar la importancia que la falta de catabolismo renal de la prolactina podía tener en el aumento de los niveles circulantes de esta hormona observado en la uremia. Simultaneamente, se pretendía evaluar la importancia relativa que en este hecho podía tener la falta de filtración glomerular por un lado y la falta de catabolismo peritubular por otro, así como la posible influencia del propio medio urémico sobre la prolactinemia basal.

1.1.- Modelos de Uremia aguda.-

Para abordar este objetivo, se han utilizado tres modelos de uremia aguda experimental en ratas: Nefrectomía bilateral (NBx), ligadura bilateral de uréteres (LBU), y autoinfusión de orina (AO) mediante una derivación vesico-femoral que reinfundía la orina en la circulación sanguínea. En los tres casos el grado de uremia, valorado por los niveles de creatinina plasmática era comparable.

La autoinfusión de orina ofrece la posibilidad de evaluar el efecto del medio urémico sobre la prolactinemia en presencia de un riñón que mantiene todas sus funciones (Emmanuel y Col. 1977). Por su parte, en la ligadura bilateral de uréteres la filtración glomerular está virtualmente ausente pero la perfusión renal está mantenida, pudiéndose evaluar el manejo peritubular de la hormona. Por último, las ratas binefrectomizadas sirven como modelo de urémia anéfrica.

Habitualmente; en este tipo de estudios se utilizan como controles ratas pseudo-operadas. Sin embargo, en este caso, al tratarse de animales urémicos cabía la duda de la validez de este tipo de controles. La PRL es una hormona muy sensible al "stress" de cualquier origen, incluido el post-quirúrgico (Lawson y Gala 1974; Brown y Col. 1977; Krulich, 1979). Sin embargo, en el caso de las ratas urémicas, dos días después de operadas

estos animales presentan un aspecto letárgico característico de su uremia, mostrando una disminución muy evidente de su capacidad de respuesta a los estímulos externos. Por su parte, las ratas SO a las 48 horas de operadas están en un evidente estado de alerta, mostrando un comportamiento agresivo claro, a pesar de su manejo habitual. Por esta razón se incluyó un segundo grupo control de animales intactos.

Analizados los resultados se observa que los niveles basales de rPRL de las ratas con AO son del mismo orden que los de los controles intactos, mientras que las ratas SO presentan una ligera pero evidente hiperprolactinemia. Estos hechos confirman que las ratas SO no son controles idóneos para este estudio, siendo más adecuados los animales intactos.

1.2.- Prolactinemia basal en los distintos modelos de Uremia aguda en ratas.-

A pesar de que el grado de uremia inducido, valorado como creatinina plasmática, es similar en los tres modelos experimentales, sólo las ratas anéfricas (NBx) o aquellas con riñones no filtrantes (LBU) presentan hiperprolactinemia, mientras que los animales que mantienen la filtración glomerular (AO) presentan una prolactinemia basal normal.

La comparación de los dos modelos de uremia con masa renal mantenida (LBU y AO) permite evaluar la importancia que la falta de filtración glomerular tiene sobre la prolactinemia basal. Una hiperprolactinemia basal importante en el grupo LBU frente a unos valores de rPRL similares a los de los controles intactos en las ratas AO, permite una doble deducción. Por un lado, se infiere que la filtración glomerular tiene un papel fundamental en el control de la prolactinemia basal, independientemente de la uremia. Por otro lado, se deduce que el propio medio urémico, al menos agudamente, no induce "per se" una elevación de los niveles basales de rPRL circulante. Estos resultados son coherentes con el hecho de que, en la rata, el riñón da

cuenta de aproximadamente 2/3 de la tasa de aclaramiento metabólico (MCR) de la rPRL (Emmanouel y Col. 1981; McKenna y Woolf 1985).

Por su parte, el hecho de que no se observen diferencias en el grado de hiperprolactinemia entre los animales anéfricos y aquellos con ligadura bilateral de uréteres, no apoya la existencia de un catabolismo peritubular de la rPRL cuantitativamente importante. Este hecho coincide con los resultados de Emmanouel y Col. (1981), que no observaron diferencias entre las MCR de las ratas LBU y NBx, a pesar de que sus experiencias en riñón de rata aislado apoyan la idea de una cierta inactivación peritubular de la hormona.

Se podía pensar que los bajos niveles de rPRL circulante en las ratas con autoinfusión de orina podían ser consecuencia de alguna sustancia presente en la orina que inactivase la rPRL plasmática. Con el fin de aclarar este punto se realizaron estudios "in vitro" en que se añadía orina de rata con AO a plasmas de ratas, controles y binefrectomizadas, en una proporción similar a la que debe tener lugar "in vivo", después de establecer la derivación vesico-femoral.

Incubados estos plasmas a 37°C durante 4 horas, no se observan cambios en la inmunorreactividad debida a rPRL, por lo que esta objeción queda descartada.

1.3.- Heterogeneidad de la Prolactina circulante en la Uremia aguda en ratas.-

A la vista de los resultados obtenidos se intentó profundizar en la patogénesis de la hiperprolactinemia urémica estudiando la importancia que la falta de catabolismo renal (filtración glomerular y/o catabolismo peritubular) así como el propio medio urémico podían tener sobre la distribución de la prolactinemia basal en sus distintas fracciones separables en sephadex G-100. Para este fin se han utilizado los mismos modelos

de uremia experimental ya comentados. Como controles se han utilizado ratas no sometidas a ningún tipo de intervención quirúrgica.

1.3.1.- Distribución de la rPRL circulante en sephadex G-100.-

Del análisis en cromatografía de penetrabilidad molecular de la prolactinemia basal de los distintos grupos de ratas estudiados, el hecho más destacable ha sido la no detección de rPRL grande en ninguna de las ratas controles o con LBU, y en sólo un caso en cada uno de los otros dos grupos (AO y NBx). En ambas ocasiones la cantidad de rPRL grande detectada ($K_{av}=0.22$ y 0.26) ha sido pequeña pero significativa, dando cuenta de alrededor del 5% de la inmunorreactividad total eluida. Al carecer de valor estadístico, estos resultados no permiten extraer conclusiones.

Con la excepción de una rata control y otra con LBU, en que el 100% de la prolactinemia eluyó como rPRL pequeña, en general siempre se detecta la rPRL grande-grande que eluye prácticamente en el volumen de exclusión de la columna.

En la literatura no se encuentran datos comparables a los aquí descritos. Los únicos datos de distribución de rPRL circulante en sephadex G-100 han sido publicados por el grupo de Lawson (Lawson y Stevens, 1980; Lawson y Col. 1984). Estos autores han estudiado la distribución de la prolactinemia en ratas hembras ovariectomizadas (OVX) en condiciones de hipersecreción inducida farmacológicamente (estrógenos, TRH, serotonina). En todos los casos la forma mayoritaria con diferencia es la rPRL pequeña, no detectándose en todos los casos las formas de mayor tamaño molecular. En sus condiciones basales (OVX + estrógenos) únicamente observan rPRL pequeña, si bien ellos mismos comentan que las formas de mayor tamaño molecular podrían estar presentes pero no ser detectadas debido a la poca sensibilidad de su ensayo (2.5 ng RP-1/ ml eluido; Lawson y Col. 1980), del orden de 10-15 veces menos sensible que el aquí descrito. En condiciones

de hipersecreción, estos autores encuentran que las formas de alto peso molecular pueden dar cuenta de hasta un 22% de la rPRL circulante.

1.3.2.- Valores cuantitativos, comparación de los modelos de uremia.-

El primer hecho a destacar es que las ratas urémicas con autoinfusión de orina, que conservan sus riñones funcionantes, presentan un patrón cromatográfico en sephadex G-100 idéntico al de los animales controles. Este hecho permite deducir que el medio urémico "per se", al menos agudamente, no sólo no aumenta los niveles circulantes de r PRL basal, sino que tampoco modifica la proporción entre sus formas circulantes. Esta circunstancia, a su vez, implica que las diferencias observadas entre los distintos grupos urémicos deben ser explicadas en base a su diferente función renal.

El segundo hecho a resaltar es que la cantidad de rPRL grande-grande es un valor prácticamente constante para el conjunto de ratas estudiadas, observándose una estrecha correlación lineal entre el total de hormona circulante y el contenido de rPRL pequeña. Esta invariabilidad en los niveles circulantes de rPRL grande-grande permite hacer dos deducciones: De un lado, la uremia aguda no parece afectar el metabolismo de esta variante de rPRL, y de otro lado la hiperprolactinemia asociada a la uremia aguda se debe al aumento de rPRL pequeña exclusivamente.

Por último, el tercer hecho importante es la total superposición de los resultados obtenidos en los grupos LBU y NBx, lo que no apoya la existencia de un catabolismo peritubular cuantitativamente importante para ninguna de las formas circulantes de rPRL.

1.4.- Patogénesis de la Hiperprolactinemia de la uremia aguda en ratas.-

A pesar del reconocimiento de la importancia del catabolismo renal de la PRL en su tasa de aclaramiento metabólico

(apartado 2.2 de la introducción) la hipótesis comunmente aceptada sobre la patogénesis de la hiperprolactinemia urémica considera su causa fundamental un aumento de la secreción, consecuencia de una alteración hipotálamo-hipofisaria mediada por la urémia (apartado 4.2.3. de la introducción). Sin embargo, los resultados obtenidos en la uremia aguda en ratas, concretamente en las ratas con autoinfusión de orina, no apoyan esta hipótesis. En estos animales con función renal mantenida, el medio urémico "per se" no induce hiperprolactinemia, ni modifica la proporción entre las distintas formas circulantes de la hormona.

De estos estudios se deduce que la hiperprolactinemia observada en la uremia aguda en ratas es la consecuencia de la acumulación de rPRL pequeña (aumento de su vida media) resultado de la disminución de su tasa de aclaramiento metabólico (MCR) al desaparecer la función de filtración glomerular, vía fundamental, si no única, de su catabolismo renal. La rPRL grande-grande, dado su tamaño molecular, no puede ser filtrada por el riñón (Maack y Col. 1979) no pareciendo cuantitativamente importante su posible catabolismo peritubular.

Nuestros resultados están en clara oposición con la hipótesis propuesta recientemente por McKenna y Woolf (1985) según la cual la patogénesis de la hiperprolactinemia de la uremia aguda en ratas radicaría de forma sustancial en una resistencia del lactotrofo a la supresión dopaminérgica hipotalámica. Estos autores han observado que el bloqueo de la síntesis de DA con α -metil-p-tirosina (AMPT; inhibidor de la tirosin hidroxilasa) induce en las ratas NBx una hiperprolactinemia mucho mayor que la observada en las ratas controles (SO), siendo esta diferencia mayor que la que cabría esperar por una disminución en la MCR de la hormona en torno al 60%. Es más, en estas condiciones, observan que la administración de DA exógena hasta alcanzar niveles circulantes similares a los observados en condiciones fisiológicas a nivel hipofisario no normalizan la prolactinemia en las ratas NBx, si bien se aprecia una reducción del 50%, mientras que en las ratas SO los niveles de hormona circulante se aproximan a los basales.

Sin embargo, es necesario hacer algunas puntualizaciones sobre los resultados obtenidos por McKenna y Woolf (1985), en función del abordaje experimental utilizado:

a) Los propios autores indican la evidencia de un mayor tono dopaminérgico en las ratas NBx previo a la inhibición con AMPT, en principio debido a la retroinhibición de la propia PRL a nivel hipotalámico. En relación con este punto, el mismo Woolf (1981) ha demostrado que, en cultivos de células hipofisarias de rata, la eliminación de un tono dopaminérgico previamente aumentado inducía un efecto de rebote sobre la secreción de PRL, alcanzándose un nivel de secreción del 200% del valor basal. Resultados similares han sido observados "in vivo" por Leebaw y Col. (1978).

b) Es un hecho conocido (Greef y Neill 1979; Neill 1980; Leong y Col. 1983) que la normalización de la secreción de PRL mediante la administración de DA exógena, tras su desrepresión mediante bloqueo de la síntesis de DA endógena con AMPT, requiere unos niveles de DA circulante unas 5 veces superiores a los observados en el tallo hipofisario en condiciones normales, mientras que niveles plasmáticos de DA equivalentes a los observados en la adeno-hipófisis en condiciones fisiológicas sólo reducen en un 40-70% la secreción de PRL desreprimida por AMPT. Precisamente, estos resultados favorecieron la hipótesis de que la DA no podía dar cuenta del 100% de la actividad PIF hipotalámica (Leong y Col. 1983).

c) En relación con el punto anterior, es importante volver a considerar el hecho discutido en el apartado 1.1, de que las ratas SO no son controles adecuados en este tipo de estudios por presentar una ligera hiperprolactinemia basal.

A la vista de lo expuesto, los resultados obtenidos por McKenna y Woolf (1985) no permiten extraer como conclusión una resistencia del Lactotrofo a la supresión dopaminérgica de la secreción de rPRL mediada por la uremia aguda, en la rata.

2.- HIPERPROLACTINEMIA EN LA UREMIA CRONICA HUMANA.-

Nuestros resultados en ratas son muy claros, pero difícilmente extrapolables a la situación de uremia crónica humana, fundamentalmente por dos motivos: el carácter agudo de la uremia en los modelos experimentales, y las diferencias observadas, respecto a la especie humana, en la distribución de la prolactinemia en sus distintas variantes separables en sephadex G-100, especialmente la ausencia de rPRL grande en la rata.

Para valorar en que medida la disminución o ausencia de catabolismo renal de la hormona estaba implicada en la patogénesis de la hiperprolactinemia asociada con la uremia crónica humana, se diseñó un abordaje experimental que permite conocer la situación metabólica de la hPRL en enfermos urémicos con distinto grado de función renal (filtración glomerular) sin plantear problemas deontológicos ni exigir una colaboración excesiva de los pacientes.

2.1.- Definición de "Índice de desaparición" (ID) en una prueba de estimulación aguda de la secreción de hPRL por TRH.-

Al estudiar el efecto de un estímulo agudo de TRH a dosis máxima sobre la secreción de hPRL en individuos sanos, Yamaji y Col. (1976) observaron que una vez alcanzado el máximo de prolactinemia, 15-20 minutos después del bolo iv de secretagogo, la disminución de los valores de hPRL circulante hasta los 120 minutos, mostraba un perfil que se ajustaba a una recta semilogarítmica ($hPRL_t = a - b \ln t$; donde $hPRL_t$ era el valor de la prolactinemia a un tiempo t).

Analizado este hecho en las distintas series descritas en la literatura, se ha observado que se trata de un fenómeno totalmente general encontrándose una estrecha correlación entre el valor de la pendiente "b" de la recta semilogarítmica de disminución de la prolactinemia y el valor máximo de prolactinemia

alcanzado, considerando a este efecto el valor de la prolactinemia a los 20 minutos del estímulo agudo con TRH ($r=0.9913$; figura 20; tabla VII; Jacobs y Col. 1973; Noel y Col. 1974; Schwinn y Col. 1975; Yamaji y Col. 1976; Assies y Col. 1980; Peces y Col. 1981; Bösze y Col. 1983).

De los resultados del análisis anterior cabía esperar que, tras un estímulo agudo con TRH a dosis máxima, la relación entre el decremento de la prolactinemia entre los 20 y 120 minutos (Δ_{20-120}) y el valor máximo de prolactinemia alcanzado en la prueba ($hPRL_{20}$) fuera constante. Efectivamente, calculando este cociente para los distintos casos descritos en la literatura citada se obtiene un valor de 0.73 ± 0.01 . A esta relación se la ha denominado "Índice de Desaparición" o ID (tabla VII).

2.1.1.- Mecanismos implicados en la regulación de la respuesta a un estímulo de secreción de PRL por TRH.-

La característica fundamental de la prueba de secreción de PRL por TRH es que a partir de una determinada dosis de secretagogo ($100 \mu g$ en forma de bolo o $5 \mu g/min$. en infusión continua) no existe relación dosis/respuesta, alcanzándose un valor máximo de prolactinemia, mayor en las mujeres que en los hombres (Jacobs y Col. 1973; Noel y Col. 1974; Schwinn y Col. 1975; Yamaji y Col. 1976; Bremner y Col. 1977; Assies y Col. 1980; Bösze y Col. 1983; Mongioi y Col. 1983).

El efecto máximo obtenido, en términos absolutos de prolactinemia, es independiente de los niveles basales de hormona circulante, no observándose respuesta ninguna en caso de una hiperprolactinemia basal importante. En este sentido, la inducción de estímulos de secreción sucesivos con TRH requiere un espaciamiento en el tiempo suficiente para que disminuya la prolactinemia previamente aumentada. (Noel y Col. 1974; Wartofsky y Col. 1976; Kleinberg y Col. 1977; Spitz y Col. 1979; Assies y Col. 1980; Peillo y Col. 1982; Hodson 1983; Mongioi y Col. 1983; Spitz y Col. 1983; Chinara y Col. 1984).

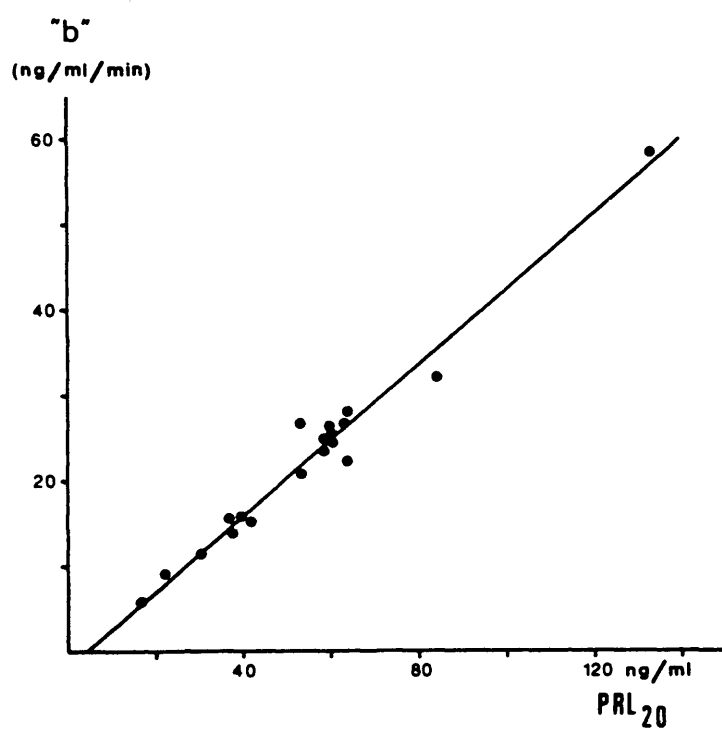


Fig. 20.- Relación entre la pendiente ("b") de la recta semilogarítmica de disminución de la prolactinemia tras un estímulo agudo con TRH y el valor máximo de prolactinemia alcanzado en la prueba (hPRL_{20}) para 19 datos extraídos de la literatura (Tabla VII). En algún caso se representan valores medios de una serie, y algunos datos de hPRL_{20} han sido calculados a partir de la correspondiente recta de disminución de la prolactinemia.

TABLA VII

VALORES DE LA PENDIENTE ("b") DE LA RECTA SEMILOGARITMICA DE DISMINUCION DE LA PROLACTINEMIA TRAS UN ESTIMULO AGUDO CON TRH, ASI COMO LAS CIFRAS DE hPRL A LOS 20 Y 120 MINUTOS Y EL CORRESPONDIENTE VALOR DE ID, PARA 19 CASOS EXTRAIDOS DE LA LITERATURA CITADA.-

"b" (ng/ml/min)	hPRL ₂₀ (ng/ml)	hPRL ₁₂₀ (ng/ml)	ID	
27'70	62	15	0'76	Jacobs y Col. 1973
11'47	30	10	0'67	
26'71	62	15	0'76	
8'85	21	6	0'71	Noel y Col. 1974
58'55	137	31	0'77	
25'90	60	16	0'73	Schwin y Col. 1975
25'69	60	14	0'77	
15'50	37	9	0'75	
22'25	63	23	0'63	Yamaji y Col. 1976
15'30	41	14	0'66	
15'39	40	12	0'70	
6'09	17	6	0'65	Assies y Col. 1980
13'99	37	11	0'70	Peces y Col. 1980
23'62	58	16	0'72	Bösze y Col. 1980
24'85	59	15	0'74	
20'63	53	16	0'70	
25'32	59	14	0'76	
26'72	53	5	0'91	
31'92	83	26	0'69	
		\bar{X}	0'73	
		D.E.	0'06	
		E.E.M.	0.01	

Todo parece indicar que es la misma prolactinemia quien bloquea su propia secreción mediante un doble mecanismo de retroinhibición uno de asa corta (hipotalámico) y otro de asa "ultra corta" a nivel del propio lactotrofo (Herbert y Col. 1979; Zacur y Col. 1982; Selmanoff y Gregerson 1984; Kadowaki y Col. 1984).

La retroinhibición de la PRL a nivel hipotalámico se transmite a través del sistema dopaminérgico (Moore y Col. 1980; Carlo y Muccioli 1981a y b; Whitworth y Col. 1981; Sarkar y Col. 1983) y si bien la TRH actúa directamente sobre los lactotrofos (Hinkle y Tashjian 1973; Hinkle y Col. 1974) su acción está controlada por la dopamina, no existiendo repuesta de secreción alguna en caso de un elevado tono dopaminérgico o en presencia de un dopaminoagonista como la Bromocriptina, o un receptor-antagonista de la DA como el Domperidone (Turpen y Knigge 1979; Brown y Col. 1979; Ylikorkala y Col. 1980; Barbadino y Col. 1982; Connell y Col. 1985; Ho y Col. 1985). Sin embargo sí es posible inducir un estímulo de secreción de prolactina en presencia de hiperprolactinemia mediante el bloqueo de la acción de la dopamina sobre el lactotrofo con dopamino-antagonistas como la metoclopramida (Spitz y Col. 1979) o el sulpiride (Mongioi y Col. 1983) o aislando la hipófisis del control hipotalámico (Adler y Sokol 1983).

2.1.2.- Significado del ID.

La variación de la prolactinemia con el tiempo depende de sus tasas de secreción y de aclaramiento metabólico (MCR). Si tras un estímulo agudo con TRH a dosis máxima la secreción de hPRL queda suprimida, la cinética de disminución de la prolactinemia después de alcanzado el máximo, o lo que es lo mismo el ID, debe ser un reflejo de la tasa de aclaramiento metabólico de la hormona circulante.

2.2.- Grupos de Enfermos.

Se han estudiado tres grupos de enfermos urémicos: Pa-

cientes anéfricos o con un aclaramiento de creatinina endógeno (C_{cr}) residual menor o igual a 5 ml/min. por lo que estaban incluidos en un programa de hemodiálisis periódica (grupo HDP). Un segundo grupo de pacientes está constituido por enfermos con insuficiencia renal crónica no terminal cuyos valores de C_{cr} estaban comprendidos entre 7 y 33 ml/min (grupo IRC). Por último, se ha estudiado un grupo de enfermos que habían recibido un trasplante renal funcional y cuyo C_{cr} varió entre 69 y 124 ml/min (grupo T).

Mientras en el grupo HDP la filtración glomerular está virtualmente ausente, entre los grupos IRC y T se ha pretendido cubrir la gama de valores de C_{cr} entre el grupo HDP y el grupo control ($C_{cr}=126.1 \pm 3.7$ ml/min.). Los individuos transplantados por su parte permiten la evaluación de la reversibilidad de las alteraciones asociadas a la uremia, ya que se trata de individuos que previamente al trasplante estuvieron en programa de hemodiálisis periódica. Para una mejor valoración del efecto del trasplante, se ha realizado un estudio emparejado en un grupo de pacientes antes y después de recibir un injerto renal funcional.

2.3.- Prolactinemia basal.

La prolactinemia basal está moderadamente elevada en el grupo de enfermos con insuficiencia renal no terminal, mientras que los enfermos en diálisis muestran una hiperprolactinemia más importante. En el grupo de individuos transplantados, la prolactinemia basal es indistinguible de la observada en el grupo control. Estos resultados son totalmente comparables a los descritos en la literatura, tanto en los valores medios de prolactinemia como en el porcentaje de individuos con hiperprolactinemia basal de cada uno de los grupos. (Hagen y Col. 1976; Ramirez y Col. 1977; Cowden y Col. 1978; Leroith y Col. 1979; Lim y Col. 1979; Gómez y Col. 1980; Lunetta y Col. 1981; Peces y Col. 1981; Procci y Col. 1981; Paniagua y Col. 1982; Mastrogiacomo y Col. 1982; Weizman y Col. 1983; Schmitz y Møller 1983; Schmitz 1984).

Cowden y Col. (1978) encontraron una correlación negativa entre la prolactinemia basal y el grado de función renal (creatinina plasmática) en un grupo de enfermos con IRC. Sin embargo, esta correlación no ha sido observada posteriormente ni por Peces y Col. (1981) ni en el presente estudio. Este hecho podría explicarse por el carácter pulsátil de la secreción de PRL, que a su vez es causa de la gran frecuencia de valores basales de PRL superiores a la normalidad observada en la práctica clínica habitual (Koninckx, 1978).

Sin embargo, si bien no se ha apreciado correlación entre prolactinemia basal y grado de función renal, sí se ha observado que la prolactinemia basal media del grupo de pacientes con IRC que mantiene un cierto grado de función renal, es mayor que la de los grupos de individuos control y transplantados, pero significativamente menor que la observada en el grupo de enfermos en programa HDP, que carecen virtualmente de función renal. Esta diferencia entre los grupos IRC y HDP también fué observada por Cowden y Col. (1978), pero no por Peces y Col. (1981), probablemente debido a que los enfermos incluidos en su grupo IRC estaban en una fase muy terminal de su enfermedad ("prediálisis").

2.4.- Prueba de estímulo de secreción con TRH.-

Veinte minutos después del estímulo agudo con TRH a dosis máxima, los niveles medios de prolactinemia de los cuatro grupos estudiados son indistinguibles entre sí. Analizada la respuesta como incremento de la prolactinemia respecto al valor basal, tanto en términos absolutos como relativos (% de Estimulación), se observa que ésta respuesta está disminuida en el grupo IRC, siendo aún menor en el grupo de enfermos en diálisis. Los resultados del grupo de enfermos transplantados son indistinguibles de los del grupo control.

Estos resultados son totalmente superponibles a los descritos previamente en la literatura, y que desde su primera

observación por Ramirez y Col. en 1977 han sido considerados como una manifestación de una disfunción hipotálamo-hipofisaria, reversible tras el trasplante renal funcionante (Ramirez y Col. 1977; Leroith y Col. 1979; Lim y Col. 1979; Gómez y Col. 1980; Peces y Col. 1981). Sin embargo, esta valoración de los resultados no parece correcta, teniendo en cuenta que la característica fundamental de la prueba de secreción de hPRL por TRH realizada es precisamente la existencia de un nivel máximo de prolactinemia inducible, siendo este valor independiente de los niveles basales de hormona circulante, y no existiendo respuesta alguna al secretagogo en presencia de una prolactinemia basal próxima al valor máximo inducible (apartado 2.1.1.).

2.4.1.- Relación del ID con la tasa de filtración glomerular.-

Dado que el riñón contribuye de forma muy importante al MCR de la hPRL, siendo su tasa de extracción renal del $16.3 \pm 3.2\%$ (Cowden y Col. 1978), y teniendo en cuenta que probablemente la degradación peritubular de la hormona, de existir, debe ser cuantitativamente poco importante, cabía esperar que en el caso de los enfermos de los grupos IRC y T se apreciase algún tipo de correlación entre su tasa de filtración glomerular (C_{cr}) y el correspondiente valor de ID. Efectivamente, mientras en el grupo control el valor de ID es indistinguible del calculado a partir de los datos de la literatura, en el grupo HDP es indistinguible de cero. Al considerar los valores individuales obtenidos en los enfermos de los grupos IRC y T, se aprecia una estrecha correlación lineal entre el ID y el $\ln C_{cr}$.

De lo dicho hasta ahora, parece deducirse que las variaciones observadas en el ID y su relación con la tasa de filtración glomerular (C_{cr}) se deben a una disminución del catabolismo renal de la hormona, pero en realidad la única forma molecular de hPRL cuantitativamente filtrable por el riñón es la hPRL pequeña. Sin embargo, como se discutirá a continuación, es precisamente esta variante de hPRL la forma mayoritaria en la circulación, muy especialmente en el caso de los enfermos urémi-

cos. En este sentido, la aplicación del concepto de Índice de Desaparición a las distintas componentes de la prolactinemia, en principio, no plantea problemas si se acepta una regulación de su secreción común para todas ellas.

2.5.- Heterogeneidad en sephadex G-100 de la hPRL circulante en la Uremia Crónica humana.-

En los cuatro grupos estudiados se han detectado las tres formas de hPRL circulante descritas, las prolactinas pequeña, grande y grande-grande. Sin embargo, mientras la hPRL pequeña está presente en todas las muestras estudiadas, una o las dos variantes de mayor tamaño molecular no son detectadas en algunos casos. La no detección de hPRL grande en un fenómeno extemporáneo, y no se aprecian diferencias entre los distintos grupos en cuanto a su incidencia. En el caso de la hPRL grande-grande, su no detectabilidad es un fenómeno significativamente más frecuente en el grupo HDP que en los otros tres grupos estudiados, observándose esta diferencia tanto en las muestras basales como en las obtenidas después del estímulo con TRH.

2.5.1.- Heterogeneidad de la hPRL circulante en individuos controles.-

La prolactinemia media del grupo control es 12 ng/ml, de los cuales alrededor del 65% corresponden a hPRL pequeña, siendo las proporciones de las formas grande y grande-grande del orden del 21 y 14% respectivamente. Estos resultados son idénticos a los descritos por Farkouh y Col. (1979), teniendo en cuenta que en ambos casos se observa una variabilidad relativamente importante. Sin embargo, estos valores son completamente diferentes a los descritos en un resumen por Kataoka y Col. (1975). Estos autores encontraron que alrededor del 72% de la hPRL circulante en condiciones basales correspondía a la forma grande-grande, detectando hPRL pequeña únicamente en 5 de los 8 individuos estudiados. Probablemente, los resultados de estos autores están afectados de errores importantes debidos a la sensibilidad de su ensayo.

2.5.1.1.- Distribución de la hPRL circulante 20 minutos después del estímulo agudo con TRH.-

A los 20 minutos de un bolo iv de TRH, el nivel medio de prolactinemia de los individuos del grupo control es de 45 ng/ml., de los cuales alrededor del 71% es hPRL pequeña, siendo los porcentajes de las formas grande y grande-grande del orden del 20 y 8% respectivamente. Estos resultados son totalmente superponibles a los descritos previamente (Suh y Frantz 1974; Kataoka y Col. 1975; Garnier y Col. 1978; Farkouh y Col. 1979; Soong y Col. 1982), no existiendo diferencias en la distribución porcentual de la prolactinemia respecto de la situación basal. A su vez, esta distribución de las tres formas de hPRL circulante es similar a la descrita en diferentes situaciones de hipersecreción, generalmente debida a la presencia de adenomas hipofisarios, independientemente del grado de hiperprolactinemia (Suh y Frantz 1972; Guyda 1975; Kataoka y Col. 1975; Garnier y Col. 1978; Kiefer y Malarkey 1978; Jordan y Kendall 1978; Soong y Col. 1982). En este sentido, nuestros resultados muestran que independientemente de la prolactinemia basal y del grado de estimulación inducido por la TRH, la proporción entre los incrementos de hPRL pequeña y hPRL grande entre la situación basal y 20 minutos después del bolo iv de TRH es prácticamente constante, correspondiendo alrededor del 75% del incremento total de la hormona a hPRL pequeña y del orden del 20% a la forma grande. En el caso de la hPRL grande-grande no ha podido observarse una relación similar, probablemente debido a sus bajos niveles circulantes muy próximos a los límites de detección del análisis y por tanto muy afectados por los errores de ensayo.

Analizados los resultados de la literatura citada más arriba, se podía apreciar que en las distintas situaciones de hiperprolactinemia en que se ha descrito su distribución molecular en sephadex G-100, la proporción entre las tres formas de prolactina, independientemente del grado de hiperprolactinemia, es similar a la ahora descrita, lo que sugiere que su secreción es simultánea y en una proporción aproximadamente constante.

2.5.1.2.- Distribución de la hPRL circulante 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.-

A los 120 minutos del estímulo agudo con TRH, la prolactinemia del grupo control es similar a la observada en condiciones basales, sin embargo la distribución porcentual de las distintas variantes de hPRL circulante permanece igual que a los 20 minutos de iniciada la prueba. Este resultado coincide con los resultados descritos por Farkouh y Col. (1979), y se corresponde con el hecho de que los valores de ID calculados para las distintas variantes de hPRL son indistinguibles del que se obtuvo para la prolactinemia total.

2.5.2.- Heterogeneidad de la hPRL circulante en los grupos urémicos.-

Analizada la distribución de la prolactinemia basal en sephadex G-100 para los distintos grupos urémicos, el hecho más destacable es que las diferencias en los niveles de hPRL total, tanto entre estos grupos entre sí como respecto al grupo control, se deben casi exclusivamente a diferencias en los niveles de hPRL pequeña. Estos resultados son similares a los observados en la uremia aguda en ratas, y como en aquel caso indican que la hiperprolactinemia observada es consecuencia de un aumento selectivo de la hPRL pequeña.

Los valores de las hPRLs grande y grande-grande en condiciones basales son prácticamente iguales, en términos cuantitativos, en los cuatro grupos estudiados, sin embargo se puede observar en ambas una cierta tendencia a disminuir con la pérdida de la función renal. En este sentido, el estudio emparejado realizado en un grupo de enfermos antes (en HDP) y después de recibir un trasplante renal funcionando confirma esta apreciación. Tras el trasplante renal, la normalización de la prolactinemia basal se asocia a una disminución drástica de los niveles de hPRL pequeña, tanto en valores absolutos como relativos,

apreciándose un aumento ligero pero significativo de las variantes grande y grande-grande, tanto en los valores netos como porcentuales.

Estas alteraciones de la prolactinemia observadas en los enfermos urémicos pueden deberse a una o varias de las siguientes causas: 1) Aumento de la tasa de secreción de la hPRL pequeña respecto de las formas grande y grande-grande. 2) Aumento de la tasa de aclaramiento metabólico de las formas de mayor tamaño molecular. 3) Disminución de la tasa de aclaramiento metabólico de la hPRL pequeña.

2.5.2.1.- Distribución de la hPRL circulante 20 minutos después del estímulo agudo con TRH.-

A los 20 minutos del bolo iv de TRH, el nivel medio de prolactinemia es similar en los tres grupos urémicos, no apreciándose diferencias con el grupo control. Sin embargo, sí se observan diferencias en la distribución de la prolactinemia en sus distintas variantes separables en sephadex G-100. La distribución porcentual es prácticamente idéntica a la observada en condiciones basales, con un marcado predominio de la hPRL pequeña que llega a dar cuenta del 95% de la prolactinemia en el caso del grupo HDP. Esta distribución es claramente diferente de la del grupo control en el caso de los grupos HDP e IRC, mientras que no se aprecian diferencias entre los grupos C y T.

Al estudiar la proporción entre los incrementos netos de hPRL pequeña y hPRL grande entre la situación basal y 20 minutos después del bolo iv de TRH, se observa que esta relación es igual a la encontrada en el grupo control. Independientemente de la prolactinemia basal y de su grado de estimulación con TRH, existe una estrecha correlación lineal entre el incremento de la hPRL total y la contribución al mismo de la hPRL pequeña y la hPRL grande, siendo las pendientes de 0.751 y 0.202 respectiva-

mente. En principio, estos resultados descartan, o al menos no apoyan, una alteración en la composición de la hormona secretada a favor de la hPRL pequeña que explicase su aumento selectivo en la circulación de los enfermos urémicos.

2.5.2.2.- Distribución de la hPRL circulante 120 minutos después del estímulo agudo con TRH.-

A los 120 minutos del estímulo agudo con TRH, la distribución porcentual de las distintas variantes de hPRL circulante analizadas es indistinguible de la observada tanto en condiciones basales como a los 20 minutos de iniciada la prueba. Se aprecia un claro predominio de la hPRL pequeña en los enfermos urémicos, más importante en el grupo HDP, siendo los resultados del grupo de enfermos transplantados muy similares a los obtenidos en el grupo control.

Al calcular el Índice de Desaparición para las distintas variantes de hPRL, no ha sido viable el análisis del ID para la hPRL grande-grande, debido a limitaciones metodológicas ya comentadas (Resultados, apartado 2.5.2). En el caso de la hPRL grande, no se aprecian diferencias entre los distintos grupos urémicos entre sí, ni de éstos respecto al grupo control, teniendo en cuenta las diferencias en el número de datos analizables en cada caso. Este número disminuye en función de la mayor prolactinemia basal, ya que ello supone una menor respuesta a la TRH.

En el caso de la hPRL pequeña, los resultados son paralelos a los obtenidos para la prolactinemia total. En el caso del grupo IRC, el valor del ID para esta variante de hPRL es algo menos de la mitad del obtenido en el grupo control, mientras en el grupo HDP es indistinguible de cero. El valor medio de ID para la forma pequeña en el grupo de enfermos transplantados se aproxima al del grupo control, pero es significativamente menor. Analizados los valores individuales de los enfermos incluidos en los grupos IRC y T (heterogéneos en cuanto a su grado de función

renal) se aprecia una estrecha correlación lineal entre el ID para la hPRL pequeña y el $\ln C_{cr}$.

Estos resultados confirman que las variaciones observadas en el ID de la hPRL total se deben a una disminución de catabolismo renal de la hormona. Efectivamente, sólo en el caso de hPRL pequeña, la única variante cuantitativamente filtrable por el riñón, se aprecia una disminución en el valor del Índice de Desaparición, observándose una estrecha correlación entre esta disminución y la pérdida de función renal (C_{cr}). El valor del ID de la hPRL grande es similar en los cuatro grupos estudiados, siendo este resultado coherente con el hecho de que dado su tamaño molecular aparente (alrededor de 50000 Da) en ningún caso el mecanismo de filtración glomerular puede ser un factor importante en su tasa de aclaramiento metabólico (Maack y Col. 1979).

2.6.- Comentarios generales al estudio en humanos.-

De los resultados de este estudio se deduce que la hiperprolactinemia asociada a la uremia crónica humana es la consecuencia de la acumulación de hPRL pequeña (aumento de su vida media) resultado de la disminución de su tasa de aclaramiento metabólico (MCR) según desaparece la función de filtración glomerular, vía fundamental, si no única, de su catabolismo renal.

No se ha observado ninguna alteración en el metabolismo de las distintas formas de hPRL que no sea imputable a la falta de filtración glomerular, y que por tanto pueda sugerir la participación de la propia situación de uremia en la patogénesis de la hiperprolactinemia, bien a través de una disfunción del control de secreción de la hormona y/o modificando el MCR de alguna(s) de sus variantes.

Las diferencias observadas en los niveles circulantes de los hPRLs grande y grande-grande entre los distintos grupos estudiados, se explican por el hecho de una menor tasa de secreción tónica, consecuencia del aumento de la vida media de la hPRL pequeña, sin afectarse las tasas de aclaramiento metabólico de las formas de mayor tamaño molecular.

3.- PATOGENESIS DE LA HIPERPROLACTINEMIA UREMICA.-

A pesar del reconocimiento del papel fundamental del riñón en el catabolismo de péptidos y proteínas de bajo peso molecular (Katz y Emmanouel 1978; Maack y Col. 1979; Emmanouel y Col. 1981; Carone y Col. 1982; Rabkin y Kitaji 1983; McKenna y Woolf 1985), a la hora de analizar la patogénesis de la hiperprolactinemia urémica, la mayoría de los autores se han decantado hacia una disfunción hipotálamo-hipofisaria, inducida por el medio urémico, como causa fundamental de la hiperprolactinemia asociada a la insuficiencia renal crónica en humanos. En un primer momento, las razones fundamentales de esta valoración estuvieron en la falta de correlación observada entre prolactinemia basal y grado de función renal (con la excepción de la serie de Cowden y Col. 1978) y en los resultados de las pruebas de estímulo y supresión de la secreción de hPRL (Ramírez y Col. 1977; Lim y Col. 1979; Leroit y Col. 1979; Gómez y Col. 1980; Sievertsen y Col. 1980; Lunetta y Col. 1981; Peces y Col. 1981; Schmitz y Møller 1983; Schmitz 1984). Posteriormente, esta hipótesis recibió un apoyo aparentemente definitivo al publicarse el trabajo de Sievertsen y Col. (1980) donde determinaban las tasas de aclaramiento metabólico y de secreción de la hPRL en enfermos en diálisis, encontrando que si bien la MCR estaba disminuida en un 33%, respecto a los individuos controles, la tasa de secreción era del orden de un 200% mayor. Muy recientemente, el trabajo de McKenna y Woolf (1985) discutido en el apartado 1.4, ha reforzado esta hipótesis al proponer la existencia de una resistencia a la supresión por DA de la secreción de PRL en ratas con uremia aguda.

3.1.- Valoración de las pruebas de estímulo y supresión de la secreción de prolactina.-

En el apartado 2.1.1. se discute ampliamente la prueba de estímulo de secreción de hPRL por TRH. Entonces ya quedó claro que la ausencia o disminución de la respuesta al TRH en presencia de unos niveles basales de hPRL aumentados no puede con-

siderarse como una evidencia de una disfunción hipotálamo-hipofisaria. En principio, los mismos comentarios son válidos en el caso de realizar la prueba de estímulo mediante inducción de una hipoglucemia insulínica (Lunetta y Col. 1981; Schmitz y Møller 1983) o la infusión iv de arginina (Schmitz y Møller 1983), ya que al menos en el primero caso la respuesta del lactotrofo esta mediada por una inhibición dopaminérgica (Leebaw y Col. 1978).

En cuanto a las pruebas de supresión de la secreción de hPRL, consisten en la inducción de un aumento del tono dopaminérgico sobre la hipófisis mediante la inyección de un bolo iv de dopamina, bromocriptina (dopamino-agonista) o L-dopa (precursor de la dopamina), valorándose el decremento de la prolactinemia en términos absolutos o relativos en los minutos siguientes al estímulo agudo. Una respuesta disminuida en los enfermos urémicos y su recuperación tras un transplante renal han sido considerados una manifestación de una disfunción hipotálamo-hipofisaria, reversible al corregir la situación de uremia (Ramirez y Col. 1977; Lim y Col. 1979; Gómez y Col. 1980; Peces y Col. 1981). Sin embargo, Gómez y Col. en 1980, ya observaron que si bien la respuesta a la bromocriptina en una prueba de supresión aguda está muy disminuida en los enfermos en diálisis, el tratamiento crónico con esta droga permite normalizar la prolactinemia de estos pacientes durante semanas, justificando la ineficacia aparente de una prueba aguda en base a un aclaramiento disminuido de la hormona circulante. Los resultados ahora discutidos apoyan claramente esta valoración.

3.2.- Valoración del método de cálculo de la tasa de secreción de prolactina.-

Sievertsen y Col.(1980) determinaron la tasa de secreción de hPRL en individuos controles y en programa de hemodiálisis, encontrando que en este segundo grupo la tasa de secreción (PR) era tres veces la del primero. Este dato lo obtenían de forma indirecta a partir de la tasa de aclaramiento metabólico (MCR) de hPRL-I¹³¹ inmunoreactiva y el valor de prolactinemia

basal (hPRL_0): $\text{PR (ng/min.)} = \text{MCR (ml/min)} \times \text{hPRL}_0 \text{ (ng/ml)}$. Este método de cálculo presenta una doble entrada de error, por un lado la determinación del MCR y por otro lado el considerar la prolactinemia basal como representativa de la prolactinemia media/24 horas. Este hecho ya ha sido comentado por Cooper y Col. (1979) al aplicar la misma metodología para determinar estos parámetros en individuos normales.

Entre las posibles causas de incertidumbre en la determinación de la MCR cabe destacar: a) La dudosa actividad biológica de la hormona marcada que garantizaría un catabolismo idéntico al de la hormona nativa, b) No considerar la heterogeneidad molecular, c) Diferencias en el volumen de distribución aparente, posiblemente relacionadas con d) La aparición de agregados del trazador. (Maack y Col. 1979; Cooper y Col. 1979; Falconer y Vacek 1983).

En todo caso, los errores en la determinación de la MCR son mínimos respecto al error que supone considerar las cifras de prolactinemia basal como representativas de la prolactinemia media a lo largo de 24 horas. El error en sí mismo, y su especial gravedad en el caso de la prolactina, ya fueron señalados por Cooper y Col. (1979). En individuos normales existe una elevación de la prolactinemia asociada al sueño (Sassin y Col. 1972; Parker y Col. 1973) además de producirse picos esporádicos de secreción durante el día. Recientemente, Schmitz (1984) ha observado que los enfermos en diálisis, si bien mantienen la presencia de picos ocasionales de secreción de prolactina durante el día, no muestran elevación de la prolactinemia asociada al sueño, manteniendo una prolactinemia media uniforme durante las 24 horas del día, valor medio que no es diferente al observado en individuos controles, si bien éstos tienen un valor de prolactinemia basal medio unas 2,5 veces menor que los enfermos urémicos. Por último cabe señalar que la prolactinemia media en condiciones basales de los enfermos en diálisis estudiados por Sievertsen y Col. (1980) era excepcionalmente elevada respecto al resto de las series recogidas en la literatura, incluida una de su propio grupo (Lim y Col. 1979).

3.3.- La disminución o ausencia de la función de filtración glomerular, causa de la Hiperprolactinemia Urémica.-

Los resultados en la uremia aguda en ratas eran concluyentes respecto a la patogénesis de la hiperprolactinemia asociada a ella. El medio urémico "per se" no tiene ningún efecto sobre la prolactinemia basal, sino que el aumento de los niveles circulantes de hormona es consecuencia de la acumulación de rPRL pequeña, resultado de la ausencia de la función de filtración glomerular. Sin embargo, el carácter agudo de la uremia, así como las diferencias de especie observadas en la distribución de la prolactinemia en sus diferentes formas circulantes no permitían trasladar las conclusiones de los estudios en ratas a la hiperprolactinemia asociada a la uremia crónica humana.

De acuerdo con lo comentado en los apartados anteriores, en la mayor parte de los estudios realizados en humanos se observan imprecisiones, bien en la valoración de los resultados o bien en los planteamientos experimentales. Con el fin de aclarar la confusión existente sobre el origen de la hiperprolactinemia urémica humana, se diseñó un protocolo experimental que ha permitido valorar el metabolismo de la prolactina (secreción y aclaramiento) en enfermos urémicos con distinto grado de función de filtración glomerular.

Los resultados en humanos han sido muy claros, concluyéndose que la hiperprolactinemia asociada a la uremia crónica es la consecuencia del aumento de la vida media de la hPRL pequeña, resultado de la disminución o ausencia de la función de filtración glomerular, no apreciándose alteración alguna imputable a la situación de uremia "per se".

En resumen, parece claro que la causa de la hiperprolactinemia asociada a la uremia es la disminución o ausencia de la función de filtración glomerular, vía fundamental, si no única, del aclaramiento renal de la hormona y el componente más importante de su tasa de aclaramiento metabólico.

4.- HIPOGONADISMO UREMICO E HIPERPROLACTINEMIA.-

Como se indicó en la Introducción (apartado 4.2.) en la génesis del hipogonadismo asociado al síndrome urémico, además de la implicación de la hiperprolactinemia se han considerado otros factores, fundamentalmente una afectación primaria mediada por la uremia a nivel gonadal y/o central, con posibles complicaciones de tipo psíquico específicos del síndrome urémico. La valoración de otros mecanismos distintos de la hiperprolactinemia se ha potenciado debido a lo poco evidente de la asociación, en el caso de la uremia, entre niveles de hPRL elevados e hipogonadismo, cuando en otras patologías esta asociación es muy evidente (apartado 3 de la Introducción). Aunque los resultados que se presentan ahora no aportan datos concretos que puedan resolver esta problemática, si pueden ayudar a aclarar algunos aspectos de la misma.

En primer lugar habría que criticar el valor clínico de las cifras de prolactinemia consideradas como basales. De lo discutido anteriormente se deduce que, en el caso de los enfermos urémicos, debido al componente pulsátil de la secreción de hPRL por un lado, y por otro lado, a la disminución del aclaramiento metabólico de la hormona, las cifras que en general se llaman basales no son representativas de la prolactinemia media de estos pacientes.

La existencia de una alteración dopaminérgica central asociada al síndrome urémico, fué propuesta por Weizman y Col.(1983) para justificar tanto la hiperprolactinemia como las alteraciones en la conducta sexual descritas en los pacientes urémicos. Los resultados ahora presentados, si bien no aportan datos concretos en este sentido, no apoyan la hipótesis citada, al menos en cuanto a la patogénesis de la hiperprolactinemia.

Por su parte, Ramirez y Col. (1977) plantearon la posibilidad de encontrar en la circulación de los enfermos urémicos hormonas parcialmente degradadas (concretamente hPRL)

que contribuyeran a explicar la falta de correlación entre los datos analíticos (hiperprolactinemia) y el hipogonadismo. Esta hipótesis ha sido apoyada por Mooradian y Col. (1985) tras estudiar la actividad biológica de la hPRL inmunorreactiva circulante en condiciones basales de pacientes (varones) en HDP, encontrando una relación Nb_2 -BA/RIA de 0,55 frente a un valor de 0.91 en el grupo control. Los resultados que ahora se discuten limitan esta hipótesis a la presencia de componentes de la hPRL pequeña con una actividad biológica disminuida o nula, no apreciándose la presencia de fragmentos inmunorreactivos, ni un desplazamiento de la prolactinemia hacia las formas de mayor tamaño molecular de discutida actividad biológica (introducción, apartado 5). Sin embargo, con respecto a la falta de correlación entre hiperprolactinemia e hipogonadismo, y la baja relación Nb_2 -BA/RIA de la PRL circulante en enfermos urémicos, no hay que descartar la posibilidad de una implicación de la "Sinlactina" propuesta por Anderson y Col. (1984) y que McNeilly y Friesen (1985) postulan que podría jugar un papel equivalente al de la Somatomedina en el caso de la GH, de forma que su producción estaría bajo control parcial de la PRL y su función sería la modulación de la acción de esta hormona en diferentes tejidos.

Por último cabe destacar el hecho de la efectividad del control de los niveles circulantes de hPRL con bromocriptina (dopamino-agonista) en la reversión del hipogonadismo asociado a situaciones de hiperprolactinemia, incluida la urémica (Bommer y Col. 1978 y 1980; Gura y Col. 1980; Lim y Col. 1980; Gomez y Col. 1980; Weizman y Col. 1983; Szücs y Col. 1984). En este sentido, hay que volver a señalar la posibilidad de un efecto terapéutico directo de la bromocriptina mediante el control de la función dopaminérgica central (Weizman y Col. 1983), pero en la valoración de este efecto habrá de tenerse en cuenta que la hiperprolactinemia urémica resulta de un aumento de la vida media de la hormona y no de una hipersecreción, generalmente asociada a una autonomía de la célula secretora respecto del control represor hipotalámico.

CONCLUSIONES.-

CONCLUSIONES

- 1.- La situación de uremia aguda "per se" no induce hiperprolactinemia en la rata.
- 2.- Tanto en la uremia aguda en ratas como en el caso de la uremia crónica humana, la hiperprolactinemia asociada se corresponde con un aumento selectivo de la PRL pequeña.
- 3.- El catabolismo renal de la PRL pequeña, tanto en la rata como en el hombre, depende fundamentalmente del proceso de filtración glomerular.
- 4.- La degradación peritubular no parece ser cuantitativamente importante en el catabolismo renal de la rPRL.
- 5.- La uremia crónica humana se asocia con una pérdida de la capacidad de aclaramiento metabólico (ID) de la hPRL pequeña, directamente relacionada con la pérdida de función de filtración glomerular (C_{cr}).
- 6.- Los mecanismos de regulación de la prolactinemia implicados en una prueba de estímulo de secreción aguda de la hormona con TRH a dosis máxima, así como la proporción entre los distintos componentes de la hPRL secretada, están conservados en la uremia crónica humana.
- 7.- Tanto en el caso de los modelos de uremia aguda como en el de los enfermos urémicos crónicos, no se aprecian alteraciones importantes en el metabolismo de las PRLs grande y grande-grande que sugieran una influencia de la propia situación de uremia sobre su secreción y/o su tasa de aclaramiento metabólico.
- 8.- En la rata, al menos en condiciones basales, la presencia de rPRL grande circulante es una excepción.

9.- La conclusión final del trabajo presentado es que el origen de la hiperprolactinemia asociada a la situación de uremia, tanto aguda en ratas como crónica en humanos, es la disminución o ausencia de la función de filtración glomerular, lo que conlleva una reducción importante de su tasa de aclaramiento metabólico, y por tanto un aumento de la vida media de la hormona circulante.

Como último comentario cabe destacar la utilidad del "Índice de Desaparición" (ID) para la valoración del metabolismo de la prolactina, así como la posible aplicación de este concepto a otros sistemas endocrinos.

- Adler R.A., H.W. Sokol; 1983. Studies of anterior pituitary-grafted rats: I. Abnormal prolactin response to thyrotropin releasing hormone, clonidine, insulin, and fasting. *Life Sciences* 32: 2949-2956.
- Advis J.P., S. Smith White, S.R. Ojeda; 1981. Delayed puberty induced by chronic suppression of release in the female rat. *Endocrinology* 109: 1321-1329.
- Advis J.P., W.W. Andrews, S.R. Ojeda; 1982. Studies on the central effect of prolactin in inducing precocious puberty in the female rat. *Brain. Res. Bull.* 8: 449- 458.
- Ambrosi B., P. Traraglini, P. Moriondo, M. Nissim, C. Nava, D. Bochicchio, G. Faglia; 1982. Effect of bromocriptine and metergoline in the treatment of hyperprolactinaemic states. *Acta Endocrinol.* 100: 10-17.
- Andersen A.N., H. Petersen, H. Djursing, B.N. Andersen, H.G. Friesen; 1982. Bioactivity of prolactin in a woman with an excess of large molecular size prolactin, persistent hyperprolactinemia and spontaneous conception. *Fertil. Steril.* 38: 625-628.
- Anderson T.R., D.S. Pitts, C.S. Nicoll; 1984. Prolactin's mitogenic action on the crop-sac mucosal epithelium involves direct and indirect mechanisms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 236-239.
- Asawaroengchai H., C.S. Nicoll; 1977. Relationships among bioassay, radioimmunoassay and disc electrophoretic assay methods of measuring rat prolactin in pituitary tissue and incubation medium. *J. Endocrinol.* 73: 301-308.
- Asawaroengchai H., S.M. Russel, C.S. Nicoll; 1978. Electrophoretically separable forms of rat prolactin with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Endocrinology* 102: 407-414.
- Assies J., A.M.P. Schellekens, J.L. Touber; 1980. The value of an intravenous TRH test for the diagnosis of tumoral prolactinaemia. *Acta Endocrinol.* 94: 439-449.
- Balmaceda J.P., C.A. Eddy, C.G. Smith, R.H. Asch; 1981. The effects of hyper-

- prolactinemia on the luteal phase of the Rhesus monkey: Evidence for a direct prolactin effect on the ovary. *Fertil. Steril.* 36: 431-432.
- Baraňao J.L.S., B. Legnani, V.A. Chiauuzi, L.M. Bertini, M.O. Suescun, J.C. Calvo, E.H. Charreau, R.S. Calandra; 1981. Effects of prolactin on androgen target tissues of immature rats. *Endocrinology* 109: 2188-2195.
- Barbadino A., L. De Marinis, C. Anile, E. Menini, G. Merlini, G. Maira; 1982. Dopaminergic mechanisms regulating prolactin secretion in patients with prolactin-secreting pituitary adenoma. Long term studies after selective transphenoidal surgery. *Metabolism* 31: 1100-1104.
- Bartke A.; 1980. Role of prolactin in reproduction in male mammals. *Federation Proc.* 39: 2577-2581.
- Basset M., G.D. Smith, R. Pease, T.J. Peters; 1984. Uptake and processing of prolactin by alternative pathways in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 769: 79-84.
- Bauer A.G.C., J.H.P. Wilson, S.W.J. Lamberts; 1980. The kidney is the main site of prolactin elimination in patients with liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 70-73.
- Ben-David M., J.G. Schenker; 1982. Human ovarian receptors to human prolactin: Implications in infertility. *Fertil. Steril.* 38: 182-187.
- Benveniste R., Helman J.D., D.N. Orth, T.J. McKenna, W.E. Nicholson, D. Rabinowitz; 1979. Circulating big human prolactin: Conversion to small human prolactin by reduction of disulfide bonds. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 883-886.
- Bern H.A.; 1983. Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. *Amer. Zool.* 23: 663-671.
- Bisbee C.A.; 1981. Prolactin effects on ion transport across cultured mouse mammary epithelium. *Am. J. Physiol.* 240: C110-C115.
- Boehm N., S. Plas-Roser, Cl. Aron; 1984. Prolactin and the control of cycle length in the female rat. *Acta Endocrinol.* 106: 188-192.

- Bohnet H.G., A.S. McNeilly; 1979. Prolactin: Assessment of its role in the human female. *Horm. Res.* 11: 533-546.
- Bommer J., E. del Pozo, E. Ritz, G. Bommer; 1978. Improved sexual function in male hemodialysis patients on bromocriptine. *Lancet* 11: 496-497.
- Bommer J., E. Ritz, E. del Pozo, G. Bommer, K. Andrassy; 1980. Reversal of disturbed sexual function in male hemodialyzed patients under bromocriptine. *Kidney Int.* 17: 402.
- Bösze P., Zs. Kóvacs, J. Egyed, J. László, G. Szilágyi; 1983. Thyrotropin and prolactin responses to thyrotrophin-releasing hormone in patients with streak gonad syndrome. *Acta Endocrinol.* 102: 179-184.
- Bratush-Marrain P., O. Björkman, W. Waldhäusl, J. Wahren; 1979. Hepatic disposal of endogenous growth hormone and prolactin in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 9: 257-260.
- Bremner W.J., R. Abreu, J.R. Stockigt, D.M. de Kretser, H.G. Burger; 1977. Pituitary-thyroid responses to 4-hour constant infusions of thyrotropin releasing hormone in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 981-987.
- Briefel G.R., P.D. Tsitouras, M.A. Kowatch, S.M. Harman, M.C. Blackman; 1982. Decreased in vitro testosterone production by isolated Leydig cells from uremic rats. *Endocrinology* 110: 976-981.
- Brocas H., A. Coevorden, H. Seo, S. Refetoff, G. Vassart; 1981. Dopaminergic control of prolactin mRNA accumulation in the pituitary of the male rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22: 25-30.
- Brown G.M., J. Seggie, J. Feldmann; 1977. Effect of psychosocial stimuli and limbic lesions on prolactin at rest and following stress. *Clin. Endocrin.* 6 Suppl.: 29S-41S.
- Brown P.M., R. Bacchus, L. Sachs, P.H. Sönksen, M. Wheeler; 1979. Bromocriptine suppression of TRH-stimulated prolactin and thyrotrophin release and accompanying inhibition of bromocriptine induced growth hormone release by TRH in normal man. *Clin. Endocrinol.* 10: 481-488.

- Buvat J., A. Lemaire, M. Buvat-Herbaut, J.C. Fourlinnie, A. Racadot, P. Fossati; 1985. Hyperprolactinemia and sexual function in men. *Hormone Res.* 22: 196-203.
- Carlo R. di, G. Muccioli; 1981a. Presence of specific prolactin binding sites in the rabbit hypothalamus. *Life Sciences* 28: 2299-2307.
- Carlo R. di, G. Muccioli; 1981b. Changes in prolactin binding sites in the rabbit hypothalamus induced by physiological and pharmacological variations of prolactin serum levels. *Brain Res.* 230: 445-450.
- Carone F.A., D.R. Peterson, G. Flouret; 1982. Renal tubular processing of small peptide hormones. *J.Lab. Clin. Med.* 100: 1-14.
- Carter J.N., J.E. Tyson, G. Tolis, S. San Vliet, C. Faiman, H.G. Friesen; 1978. Prolactin-secreting tumors and hypogonadism in 22 men. *N. Eng. J. Med.* 299: 847-852.
- Caufriez A.; 1985. Menstrual disorders associated with hyperprolactinemia. *Hormone Res.* 22: 209-214.
- Cheng C.H.K., T.M. Wong, J. Blake, C.H. Li; 1981. Ovine prolactin. Isoelectrofocusing and characterization of the separated components. *Int. J. Protein Res.* 18: 343-347.
- Cheung C.Y.; 1983. Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology* 113 : 632-638.
- Chihara K., J. Iwasaki, N. Minamitani, H. Kaji, H. Kodama, T. Fujita, K. Shirataki, N. Tamaki, S. Matsumoto; 1984. Prolactin secretion from human prolactinomas perfused in vitro: Effect of TRH, prostaglandin E₁, Theophylline, dopamine, and dopamine receptor blockers. *Acta Endocrinol.* 105: 6-13.
- Clemens J.A., C.J. Shaar; 1980. Control of prolactin secretion in mammals. *Federation Proc.* 39: 2588-2592.
- Clemens J.A., C.J. Shaar, E.B. Smalstig; 1980. Dopamine, PIF, and other regu-

- lators of prolactin secretion. Federation Proc. 39: 2907-2911.
- Connell J.M.C., S.G. Ball, A.J. Balmforth, G.L. Davies; 1985. Effect of low-dose dopamine infusion on basal and stimulated TSH and prolactin concentrations in man. Clin. Endocrinol. 23: 185-192.
- Cooke N.E., D. Coit, J. Shine, J.D. Baxter, J.A. Martial; 1981. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. J. Biol. Chem. 256: 4007-4016.
- Cooper D.S., E.C. Ridgway, B. Kliman, R.N. Kjellberg, F. Maloof; 1979. Metabolic clearance and production rates of prolactin in man. J. Clin. Invest. 64: 1669-1680.
- Cowden E.A., W.A. Ratcliffe, J.G. Ratcliffe, J.W. Dobbie, A.C. Kennedy; 1978. Hyperprolactinemia in renal disease. Clin. Endocrinol. 9: 241-248.
- Crosignani P.G., C. Errari, A. Malinverni, C. Barbieri, A.M. Mattei, R. Caldana, M. Rocchetti; 1980. Effect of central nervous system dopaminergic activation on prolactin secretion in man: Evidence for a common central defect in hyperprolactinemic patients with and without radiologic signs of pituitary tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51: 1068-1073.
- Dannies P.S., M.S. Rudnick; 1980. 2-Bromo- α -ergocryptine causes degradation of prolactin in primary cultures of rat pituitary cells after chronic treatment. J. Biol. Chem. 255: 2776-2781.
- Day S.L., H.J. Kirchick, L. Birnbaumer; 1980. Effect of prolactin on luteal functions in the cyclic rat: Positive correlation between luteinizing hormone-stimulated adenylyl cyclase activity and progesterone secretion; role in corpus luteum rescue of the morning surge of prolactin on day 3 of pseudopregnancy. Endocrinology 106: 1265-1269.
- Delouis C., J. Fevre, G. Kann; 1982. Mammogénèse et lactogénèse. En : Prolactine, neurotransmission et fertilité. Ed. por H. Clauser y J.P. Gautray. Masson et Cie. Editeurs (Paris). pp. 21-32.
- Demarest K.T., G.D. Riegler, K.E. Moore; 1984. Prolactin-induced activation of

- tuberoinfundibular dopaminergic neurons: Evidence for both a rapid "tonic" and delayed "induction" component. *Neuroendocrinology* 38: 467-475.
- Djursing H., C. Hagen, F. Christensen, C. Nickelsen; 1981. Bromocriptine and estrogen modulation of gonadotrophin release in normo- and hyperprolactinaemic patients with amenorrhoea. *Clin. Endocrinol.* 15: 125-132.
- Doolan P.D., E.L. Alpen, C.B. Theil; 1969. A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine. *Am. J. Med.* 32: 65-79.
- Dorrington J.H., R.E. Gore-Langton; 1982. Antigonadal action of prolactin: Further studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat G cell cultures. *Endocrinology* 110: 1701-1707.
- Dudley C.A., T.S. Jamison, R.L. Moss; 1982. Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. *Endocrinology* 110: 677-679.
- Emmanouel D.S., M.D. Lindheimer, A.I. Katz; 1977. Uremia in rats with normal kidneys: A model for the study of renal function in a uremic environment. *Kidney Int.* 11: 209-212.
- Emmanouel D.S., V.S. Fang, A.I. Katz; 1981. Prolactin metabolism in the rat: Role of the kidney in degradation of the hormone. *Am. J. Physiol.* 240: F437-F445.
- Emmanouel D.S.; 1983. Metabolism of prolactin and other hormones by the normal kidney and in uremia. *En: Prolactin and prolactinomas*. Ed. por G. Tolis y col. Raven Press (New York). pp. 241-248.
- Esquifino A.I., J.A. Ramos, J.A.F. Tresguerres; 1984. Possible role of dopamine in changes in LH and prolactin concentrations after experimentally induced hyperprolactinemia in rats. *J. Endocrinol.* 100: 141-148.
- Fagin K.D., J.D. Neill; 1981. The effect of dopamine on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinology* 109: 1835-1840.

- Falconer I.R., A.T. Vacek; 1983a. Degradation of ^{125}I -labelled prolactin in the rabbit: Effect of nephrectomy and prolactin infusion. *J. Endocrinol.* 99: 369-377.
- Falconer I.R., A.T. Vacek; 1983b. Degradation of prolactin by the mammalian kidney. En: *Prolactin and prolactinomas*. Ed. por G. Tolis y col. Raven Press (New York). pp. 231-240.
- Farkouh N.H., M.G. Packer, A.G. Frantz; 1979. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: High proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 1026-1032.
- Ferland L., F. Labrie, P.A. Kelly, V. Raymond; 1980. Interactions between hypothalamic and peripheral hormones in the control of prolactin secretion. *Federation Proc.* 39: 2917-2922.
- Ferrari C., C. Scarduelli, P. Pampini, G. Brambilla, R. Benco, E. Pistolesi, A. Paracchi, A. Mattei, M. Boghen, P.G. Crosignani; 1983. Prolactin response to the dopamine antagonists sulpiride and domperidone. Further evidence for pituitary dopamine deficiency in the hyperprolactinemic disorders of different etiology. *Gynecol. Obstet. Invest.* 16: 299-306.
- Ferrari T., G. Baggio, V. Mangiafico; 1985. The dopamine autoreceptor agonist B-HT 920 markedly stimulates sexual behavior in male rats. *Experientia* 41: 636-638.
- Fink G.; 1985. Has the prolactin inhibiting peptide at last been found? *Nature* 316: 487-488.
- Frantz A.G., D.L. Kleinberg; 1970. Prolactin: Evidence that it is separate from growth hormone in human blood. *Science* 170: 745-747.
- Garnier P.E., M.L. Aubert, S.L. Kaplan, M.M. Grumbach; 1978. Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: Decreased affinity of "Big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 1273-1281.

- Goldsmith P.C., M.J. Cronin, R.I. Weiner; 1979. Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1205-1207.
- Gomez F., R. De la Cueva, J.-P. Wauters, T. Lemarchand-Béraud; 1980. Endocrine abnormalities in patients undergoing long-term hemodialysis. *Am. J. Med.* 68: 522-530.
- Gonzalez M.D., F. López, E. Aguilar; 1984. Involvement of prolactin in the onset of puberty in female rats. *J. Endocrinol.* 101: 63-68.
- Greef W.J., J.D. Neill; 1979. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 105: 1093-1099.
- Greef W.J., T.J. Visser; 1981. Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocrinol.* 91: 213-223.
- Gudelsky G.A., D.D. Nansel, J.C. Porter; 1980. Uptake and processing of dopamine by cells of the anterior pituitary gland. *Endocrinology* 107: 30-34.
- Gura V., A. Weizman, B. Maoz, D. Zevin, M. Ben-David; 1980. Hyperprolactinemia: A possible cause of sexual impotence in male undergoing chronic hemodialysis. *Nephron* 26: 53-54.
- Guyda H.J.; 1975. Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: Immunoassay and radioreceptor assay correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 953-967.
- Hagen C., K. Ølgaard, A.S. McNeilly, R. Fisher; 1976. Prolactin and the pituitary-gonadal axis in male uraemic patients on regular dialysis. *Acta. Endocrinol.* 82: 29-38.
- Haisenleder D.J., D.M. Lawson, R.R. Gala; 1984. The effect of steroids on the size heterogeneity of pituitary prolactin in castrate male rats. *Life Sciences* 34: 31-36.
- Hamada Y., S. Schlaff, Y. Kobayashi, R. Santulli, K.H. Wright, E.E. Wallach; 1980. Inhibitory effect of prolactin on ovulation in the in vitro perfu-

- sed rabbit ovary. *Nature* 285: 161-163.
- Hanley D.A., L.M. Sherwood; 1978. Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. Pathophysiology and treatment. *Med. Clin. North Am.* 62: 1319-1339.
- Haro L.S., F.J. Talamantes; 1985a. Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL. I. Biochemical characterization, isolation, and purification of their electrophoretic isoforms. *Endocrinology* 116: 346-352.
- Haro L.S., F.J. Talamantes; 1985b. Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL. II. Role of amides in receptor binding and immunoreactivity. *Endocrinology* 116: 353-358.
- Harris K.H., B.D. Murphy; 1981. Prolactin in maintenance of the corpus luteum of early pseudopregnancy in the golden hamster. *J. Endocrinol.* 90: 145-150.
- Herbert D.C., H. Ishikawa, E.G. Rennels; 1979. Evidence for autoregulation of hormone secretion by prolactin. *Endocrinology* 104: 97-100.
- Hinkle P.M., A.H. Tashjian Jr.; 1973. Receptors for thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing rat pituitary cells in culture. *J. Biol. Chem.* 248: 6180-6186.
- Hinkle P.M., E.L. Woroch, A.H. Tashjian Jr.; 1974. Receptor-binding affinities and biological activities of analogs of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing pituitary cells in culture. *J. Biol. Chem.* 249: 3085-3090.
- Hinkle P.M., A.H. Tashjian Jr.; 1975. Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH₃ strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 14: 3845-3851.
- Ho K.Y., G.A. Smythe, L. Lazarus; 1985. The interaction of TRH and dopaminergic mechanisms in the regulation of stimulated prolactin release in man. *Clin. Endocrinol.* 23: 7-16.
- Hodson C.A.; 1983. Evidence of prolactin short loop feedback in the postpartum

- lactating rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173: 441-446.
- Hosojima H., J.H. Wyche; 1985. Prolactin control of growth and prolactin auto regulation in cultured human pituitary cells. *Hormone Res.* 21: 240-245.
- Hudson L., F.C. Hay; 1976. *Immunology*. Blackwell Scientific Publications (Oxford) pp. 12.
- Hunter W.M., F.C. Greenwood; 1962. Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-496.
- Hwang P., H. Guyda, H. Friesen; 1971. A radioimmunoassay for human prolactin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 1902-1906.
- Jacobs L.S., P.J. Snyder, R.D. Utiger, W.H. Daughaday; 1973. Prolactin response to thyrotropin-releasing hormone in normal subjects. *J. Clin. End. Metab.* 36: 1064-1073.
- Jordan R.M., J.W. Kendall; 1978. Dissociation of plasma and CSF prolactin heterogeneity. *Acta Endocrinol.* 89: 38-47.
- Judd S.J., J.S. Rakoff, S.S.C. Yen; 1978. Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: Effect of endogenous estradiol levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 494-498.
- Kadowaki J., N. Ku, W.S. Oetting, A.M. Walker; 1984. Mammoth autoregulation: Uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology* 114: 2060-2067.
- Kalra P.S., J.W. Simpkins, W.G. Luttge, S.P. Kalra; 1983. Effects on male sex behavior and preoptic dopamine neurons of hyperprolactinemia induced by MtTW15 pituitary tumors. *Endocrinology* 113: 2065-2071.
- Kataoka K., Y. Imai, C.S. Hollander; 1975. Altered molecular heterogeneity of circulating prolactin following thyrotropin releasing hormone. *Clin. Res.* 23: 238-A.
- Katz A.I., D.S. Emmanouel; 1978. Metabolism of polypeptide hormones by the normal kidney and in uremia. *Nephron* 22: 69-80.
- Kauli R., A. Schoenfeld, Y. Ovadia, S. Math, S. Assa, Z. Lavon; 1985. Delayed

- puberty and hypoplastic uterus associated with hyperprolactinemia: Successful treatment with bromocriptine. *Hormone Res.* 22: 68-73.
- Kauppila A., Leinonen P., R. Vinke, P. Ylöstalo; 1982. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia impairs ovarian follicle maturation and corpus luteum function in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 955-960.
- Keenan E.J., P.A. Klase, J.A. Thomas; 1981. Interaction between prolactin and androgens in the accessory sex organs of male mice. *J. Endocrinol.* 90 : 323-330.
- Kiefer K.A., W.B. Malarkey; 1978. Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: Experimental conditions that alter gel filtration patterns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46: 119-124.
- Kleinberg D.L., G.L. Noel, A.G. Frantz; 1977. Galactorrhea: A study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors. *New Eng. J. Med.* 296: 589-600.
- Kleinberg D.L., W. Niemann, E. Flamm, P. Cooper, G. Babitsky, Q. Valensi; 1985. Primate mammary development. Effects of hypophysectomy, prolactin inhibition, and growth hormone administration. *J. Clin. Invest.* 75: 1943-1950.
- Klindt J., M.C. Robertson, H.G. Friesen; 1982. Episodic secretory patterns of rat prolactin determined by bioassay and radioimmunoassay. *Endocrinology* 111: 350-352.
- Kohmoto K., S. Tsunasawa, F. Sakiyama; 1984. Complete amino acid sequence of mouse prolactin. *Eur. J. Biochem.* 138: 227-237.
- Koninckx P.; 1978. Stress hyperprolactinemia in clinical practice. *Lancet* I : 273.
- Krulich L.; 1979. Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. *Ann. Rev. Physiol.* 41: 603-615.
- Larrea F., C. Villanueva, M.C. Cravioto, A. Escorza, O. del Real; 1985. Further evidence that big-big prolactin is preferentially secreted in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil. Steril.* 44:

25-30.

- Lawson D.M., R.R. Gala; 1974. The influence of surgery, time of day, blood volume reduction and anesthetics on plasma prolactin in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.* 62: 75-83.
- Lawson D.M., R.W. Stevens; 1980. Size heterogeneity of pituitary and plasma prolactin: Effect of chronic estrogen treatment. *Life Sciences* 27: 1489-1494.
- Lawson D.M., R.R. Gala, M.L. Chin, D.H. Haisenleder; 1980. Size heterogeneity of plasma prolactin in the rat: TRH and serotonin-induced changes. *Life Sciences* 27: 1147-1151.
- Lawson D.M., N. Sensui, D.H. Haisenleder, P.N. Kaufman, R.R. Gala; 1984. Prolactin levels and molecular heterogeneity in rat strains with high and low incidence of DMBA-induced mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 4: 129-136.
- Leebaw W.F., L.A. Lee, P.D. Woolf; 1978. Dopamine affects basal and augmented pituitary hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 480-487.
- Lemarchand-Béraud T., O. Reymond, C. Waeber; 1983. Hyperprolactinemia reduced in vivo and in vitro testosterone production in the rat. *Hormone Res.* 18: 148.
- Leong D.A., L.S. Frawley, J.D. Neill; 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 109-127.
- Leroith D., G. Danovitz, S. Trestan, I.M. Spith; 1979. Dissociation of prolactin response to thyrotropin-releasing hormone and metoclopramide in chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 815-817.
- Leung F.C., S.M. Russell, C.S. Nicoll; 1978. Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat serum. *Endocrinology* 103: 1619-1628.
- Leung F.C.; 1980. Relationship between radioreceptorassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat pituitary tissue, incubation medium,

- and serum: Effects of dialysis on measurements of the hormone. *Endocrinology* 106: 61-67.
- Lewis U.J.; 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 33-42.
- Lewis U.J., R.N.P. Singh, L.J. Lewis, B.K. Seavey, Y.N. Sinha; 1984. Glycosylated ovine prolactin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 385-389.
- Lewis U.J., R.N.P. Singh, Y.N. Sinha, W.P. Vanderlaan; 1985. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116: 359-363.
- Lim V.S., S.C. Kathpalia, C. Henriquez; 1978. Endocrine abnormalities associated with chronic renal failure. *Med. Clin. North Am.* 62: 1341-1361.
- Lim V.S., S.C. Kathpalia, L.A. Frohman; 1979. Hyperprolactinemia and impaired pituitary response to suppression and stimulation in chronic renal failure: Reversal after transplantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 101-107.
- Lim V.S., C. Henriquez, G. Sievertsen, L.A. Frohman; 1980. Ovarian function in chronic renal failure: Evidence suggesting hypothalamic anovulation. *Ann. Int. Med.* 93: 21-27.
- Locatelli V., F. Petraglia, A. Penalva, A.E. Panerai; 1983. Effect of dopaminergic drugs on hypothalamic and pituitary immunoreactive β -endorphin concentrations in the rat. *Life Sciences* 33: 1711-1717.
- Lunetta M., E. Infantone, D. Spanti, M. Mughini; 1981. Lack of prolactin response to insulin induced hypoglycaemia in uraemic patients. *IRCS Med. Sci.* 9: 141-142.
- Maack T., V. Johnson, S.T. Kau, J. Figueiredo, D. Sigulem; 1979. Renal filtration, transport and metabolism of low molecular weight proteins: A review. *Kidney Int.* 16: 251-270.
- Magoffin D.A., G.F. Erickson; 1982. Prolactin inhibition of luteinizing hormone-stimulated androgen synthesis in ovarian interstitial cells cultured in defined medium: Mechanisms of action. *Endocrinology* 111: 2001-2007.

- Magrini G., J.R. Ebner, P. Burckhardt, J.P. Felber; 1976. Study on the relationship between plasma PRL levels and androgen metabolism in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 944-947.
- Magrini G., H.U. Iselin, J.R. Ebner, J.P. Felber; 1979. New aspects of androgens, prolactin and ACTH interaction in men. *Arch. Androl.* 2: 141-155.
- Malcolm A.D.B.; 1981. Production and processing of prolactin. *Nature* 290:546.
- Marchetti M., F. Labrie; 1982. Prolactin inhibits pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat. *Endocrinology* 111: 1209-1213.
- Mastrogiacono I., V. Feghali, L. De Besi, E. Serafini, L. Gasparotto; 1982. Prolactin, gonadotropins, testosterone, and estrogens in uremic men undergoing periodic hemodialysis. *Arch. Androl.* 9: 279-282.
- Mastrogiacono I., L. De Besi, E. Serafini, S. Zussa, P. Zucchetta, C.F. Romagnoli, E. Saporiti, P. Dean, C. Ronco, A. Adami; 1984. Hyperprolactinemia and sexual disturbances among uremic women on hemodialysis. *Nephron* 37: 195-199.
- Maurer R.A.; 1981. Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294: 94-97.
- Maurer R.A.; 1982. Relationship between estradiol, ergocryptine, and thyroid hormone: Effects on prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 110: 1515-1520.
- McKenna T.M., P.D. Woolf; 1985. Prolactin metabolic clearance and resistance to dopaminergic suppression in acute uremia. *Endocrinology* 116: 2003-2007.
- McNeilly A.S., H.G. Friesen; 1985. Presence of a nonlactogenic factor in human serum with synergistically enhancer prolactin-stimulated growth of Nb₂ rat lymphoma cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 408-411.
- Meuris S., M. Svoboda, M. Vilamala, J. Christophe, C. Robyn; 1983. Monomeric pituitary growth hormone and prolactin variants in man characterized by immunoperoxidase electrophoresis. *FEBS Letters* 154: 111-115.

- Meuris S., M. Svoboda, J. Christophe, C. Robyn; 1984. Clearing of disulfide bridges and apparent molecular weight of human prolactin variants as revealed by immunoperoxidase electrophoresis. *Anal. Biochem.* 143:163-169.
- Mittra I.; 1980a. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1750-1759.
- Mittra I.; 1980b. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1760-1767.
- Mongioi A., A. Aliffi, E. Vicari, F. Coniglione, U. Scapagnini, R. D'Agata; 1983. Down-regulation of prolactin secretion in men during continuous thyrotropin-releasing hormone infusion: Evidence for induction of pituitary desensitization by continuous TRH administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 904-907.
- Mooradian A.D., J.E. Morley, W.P. Korchik, K.W. Ma, M.A. Hartfel, J.A. Parsons; 1985. Comparison between bioactivity and immunoreactivity of serum prolactin in uraemia. *Clin. Endocrinol.* 22: 241-247.
- Moore K.E., K.T. Demarest, C.A. Johnston; 1980. Influence of prolactin on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. *Federation Proc.* 39: 2912-2916.
- Morley J.E., L.A. Distiller, S. Unterhalter, J.B. Mayers, R. Rabkin, M. Katz; 1978. Effect of renal transplantation on pituitary gonadal function. *Metabolism* 27: 781-785.
- Müller E.E., V. Locatelli, S. Cella, A. Peñalva, A. Novelli, D. Cocchi; 1983. Prolactin-lowering and -releasing drugs mechanisms of action and therapeutic applications. *Drugs* 25: 399-432.
- Murrabi A.K., V. Mericq, M.C. Gelato, M.C.S. Koppelman, B.D. Albertson, D.L. Lariaux, F. Cassorla; 1985. The effects of prolactin on testicular steroidogenic enzyme activities. *Horm. Metabol. Res.* 17: 47-48.

- Nag S., S. Sanyal, K.K. Ghosh, N.M. Biswas; 1981. Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. *Hormone Res.* 15: 72-77.
- Nakagawa K., T. Obara, M. Matsubara, M. Kubo; 1982. Relationship of changes in serum concentrations of prolactin and testosterone during dopaminergic modulation in males. *Clin. Endocrinol.* 17: 345-352.
- Nansel D.D., G.A. Gudelsky, M.J. Reymond, J.C. Porter; 1981. Estrogen alters the responsiveness of the anterior pituitary gland to the actions of dopamine on lysosomal enzyme activity and prolactin release. *Endocrinology* 108: 903-907.
- Neill J.D.; 1980. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. En: "Frontiers in neuroendocrinology", Ed. por L. Martini y W.F. Ganong; Raven Press, New York. PP. 129-155.
- Nicoll C.S.; 1967. Bio-assay of prolactin. Analysis of the pigeon crop-sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method. *Endocrinology* 80: 641-655.
- Nicoll C.S.; 1980. Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Federation Proc.* 39: 2563-2566.
- Nikolics K., A.J. Mason, E. Szönyi, J. Ramachandran, P.H. Seeburg; 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316: 511-517.
- Noel G.L., R.C. Dimond, L. Wartofsky, J.M. Earll, A.G. Frantz; 1974. Studies of prolactin and TSH secretion by continuous infusion of small amounts of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 6-17.
- Nyberg F., P. Roos, L. Wide; 1980. Human pituitary prolactin. Isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochem. Biophys. Acta* 625: 255-265.
- Nyberg F., P. Roos, L. Wide; 1981. Purification and characterization of high

- molecular weight human pituitary prolactin. *Preparative Biochem.* 11: 437-466.
- Nyberg F., P. Roos, O. Isaksson; 1982. Isolation of rat pituitary prolactin iso-
hormones differing in charge, size, and specific immunological activity.
Preparative Biochem. 12: 153-173.
- Ohlson D.L., J. Spicer, S.L. Davis; 1981. Use of active immunization against
prolactin to study the influence of prolactin on growth and reproduction
in the ram. *J. Animal Sci.* 52: 1350-1359.
- Oliver C., R.S. Mical, J.C. Porter; 1977. Hypothalamic- pituitary vasculature:
Evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology*
101: 598-604.
- Oseko F., A. Taniguchi, T. Kono, H. Imura, Y. Komatsu; 1983. Improvement of
ejaculatory incompetence with bromocriptine in a man with prolactin-secre-
ting tumor. *J. Urol.* 129: 835-836.
- Paniagua R., F. Arreola, J. Herrera, A. Perez, S. Díaz, L. Mondragón, O. Sere-
no, S. Villalpando, E. Exaire, J.A. Bermudez; 1982. Zinc, prolactin, gona-
dotropins and androgen levels in uremic men. *Arch. Androl.* 8: 271-275.
- Pansini F., C.M. Bergamini, M. Malfaccini, G. Cocilovo, M. Linciano, M. Jacobs,
B. Bagni; 1985. Multiple molecular forms of prolactin during pregnancy in
women. *J. Endocrinol.* 106: 81-85.
- Parker D.C., L.G. Rossman, E.G. Vanderlaan; 1973. Sleep-related nyctohemeral
and briefly episodic variation in human plasma prolactin concentrations.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 1119-1124.
- Peces R., C. Horcajada, J.M. López-Novoa, M.A. Frutos, S. Casado, L. Hernando;
1981. Hyperprolactinemia in chronic renal failure: Impaired responsive-
ness to stimulation and suppression. Normalization after transplantation.
Nephron 28: 11-16.
- Peillon F., M. Vincens, F. Cesselin, R. Doumith, J. Mowszowicz; 1982. Exagera-
ted prolactin response of thyrotropin-releasing hormone in women with

- anovulatory cycles: Possible role of endogenous estrogens and effect of bromocriptine. *Fertil. Steril.* 37: 530-535.
- Pepperell R.J.; 1981. Prolactin and reproduction. *Fertil. Steril.* 35:267-274.
- Peterson E.A., H.A. Sober; 1962. Column chromatography of proteins: Sustituted cellulose. *Methods in Enzymology* 5: 3.
- Phillips H.S., K. Nikolics, D. Branton, P.H. Seeburg; 1985. Immunocytochemical localization in rat brain of a prolactin release-inhibiting sequence of gonadotropin-releasing hormone prohormone. *Nature* 316: 542-545.
- Plotsky P.M., J.D. Neill; 1982. Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 111: 168-172.
- Pocius P.A., C.R. Baumrucker, J.P. McNamara, D.E. Bauman; 1980. -glutamyl transpeptidase in rat mamary tissue. Activity during lactogenesis and regulation by prolactin. *Biochem. J.* 188: 565-568.
- Posner B.I., P.A. Kelly, H.G. Friesen; 1974. Induction of a lactogenic receptor in rat liver: Influence of estrogen and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2407-2410.
- Procci W.R., D.A. Goldstein, J. Adelstein, S.G. Massry; 1981. Sexual dysfunction in the male patient with uremia: A reappraisal. *Kidney Int.* 19: 317-323.
- Quigley M.E., S.J. Judd, G.B. Gillihad, S.S.C. Yen; 1980. Functional studies of dopamine control of prolactin secretion in normal women and women with hyperprolactinemic pituitary microadenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 994-998.
- Ramirez G., W.M. O'Neill Jr., H.A. Bloomer, W. Jubiz; 1977. Abnormalities in the regulation of prolactin in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 658-661.
- Rasmussen C., T. Bergh, S.J. Nillius, L. Wide; 1985. Return of menstruation and normalization of prolactin in hyperprolactinemic women with bromo-

- criptine-induced pregnancy. *Fertil. Steril.* 44: 31-34.
- Reymond M.J., J.C. Porter; 1985. Involvement of hypothalamic dopamine in the regulation of prolactin secretion. *Hormone Res.* 22: 142-152.
- Rogol A.D., S.W. Rowen; 1974. Prolactin of apparent large molecular size: The major immunoactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 714-717.
- Rosenfeld M.G., S.G. Amara, N.C. Birnberg, J.J. Mermod, G.H. Murdoch, R.M. Evans; 1983. Calcitonin, prolactin and growth hormone gene expression as model systems for the characterization of neuroendocrine regulation. *Recent Prog. Hormone Res.* 39: 305-351.
- Rowe R.C., E.A. Cowden, C. Faïman, H.G. Friesen; 1983. Correlation of Nb₂ bioassay and radioimmunoassay values for human serum prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 942-946.
- Sarkar D.K., N. Miki, J. Meites; 1983. Failure of prolactin short loop feedback mechanism to operate in old as compared to young female rats. *Endocrinology* 113: 1452-1458.
- Sarkar D.K., P.E. Gottschall, Q.W. Xie, J. Meites; 1984. Reduced tuberoinfundibular dopaminergic neuronal function in rats with in situ prolactin-secreting pituitary tumors. *Neuroendocrinology* 38: 498-503.
- Sarkar D.K., S.S.C. Yen; 1985. Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: A possible role for β -endorphin as a mediator. *Endocrinology* 116: 2080-2084.
- Sassin J.F., A.G. Frantz, E.D. Weitzman, S. Kaplan; 1972. Human prolactin: 24 hour pattern with increased release during sleep. *Science* 177: 1205-1207.
- Schams D., I. Rüsse, E. Schallenger, S. Prokopp, J.S.D. Chan; 1984. The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on mammary gland development in ewes and heifers. *J. Endocrinol.* 102: 121-130.
- Schmitz O., J. Möller; 1983. Impaired prolactin response to arginine infusion and insulin hypoglycaemia in chronic renal failure. *Acta Endocrinol.* 102:

486-491.

- Schmitz O.; 1984. Absence of diurnal plasma prolactin rhythm in diabetic and non-diabetic uraemic patients. *Acta Endocrinol.* 105: 173-178.
- Schwartz M.F., J.E. Bauman, W.H. Masters; 1982. Hyperprolactinemia and sexual disorders in men. *Biol. Psychiatry* 17: 861-876.
- Schiwinn G., A. von zur Mühlen, J. Köbberling, E. Halves, K.W. Wenzel, H. Meinhold; 1975. Plasma prolactin levels after TRH and chlorpromazine in normal subjects and patients with impaired pituitary function. *Acta Endocrinol.* 79: 663-676.
- Seeburg P.H., J.P. Adelman; 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311: 666-668.
- Selmanoff M., K.A. Gregerson; 1984. Autofeedback effects of prolactin on basal suckling-induced, and proestrous secretion of prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175: 398-405.
- Selmanoff M.; 1985. Rapid effects of hyperprolactinemia on basal prolactin secretion and dopamine turnover in the medial and lateral median eminence. *Endocrinology* 116: 1943-1952.
- Semple C.G., G.H. Beastall, I.S. Henderson, J.A. Thomson, A.C. Kennedy; 1982. The pituitary-testicular axis of uraemic subjects on haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Acta Endocrinol.* 101:464-467.
- Servely J.L., B. Teyssot, L.M. Houdebine, C. Delouis, J. Djiane; 1982. Evidence that the activation of casein gene expression in the rabbit mammary gland can be elicited by a low amount of prolactin firmly retained on its receptors. *Biochimie* 64: 133-140.
- Sharpe R.M., A.S. McNeilly; 1979. The effect of induced hyperprolactinemia on Leydig cell function and LH-induced loss of LH-receptors in the rat testis. *Molec. Cell. Endocrinol.* 16: 19-27.
- Shenai R., M. Wallis; 1979. Biosynthesis and degradation of prolactin in the rat anterior pituitary gland. Time course of incorporation of label in

- vitro and evidence for rapid degradation. *Biochem J.* 182: 735-743.
- Sherwood L.M.; 1971. Human prolactin. *New Eng. J. Med.* 284: 774-777.
- Sheth A.R., A.N. Gunjkar, G.V. Shah; 1979. Effect of LH, prolactin and sperm_ine on ATPase activity of human spermatozoa. *Andrologia* 11: 11-14.
- Shiu R.P.C., P.A. Kelly, H.G. Friesen; 1973. Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* 180: 968-971.
- Shiu R.P.C., H.G. Friesen; 1980. Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Ann. Rev. Physiol.* 42: 83-96.
- Shome B., A.F. Parlow; 1977. Human pituitary prolactin (hPRL): The entire linear amino acid sequence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 1112-1115.
- Shoupe D., Month F.J., O.A. Kletzky, G.S. di Zerega; 1983. Prolactin molecular heterogeneity. Response to Thyrotropin-releasing hormone stimulation of concanavalin A-bound and -unbound immunoassayable prolactin during human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147: 482-487.
- Sievertsen G.D., V.S. Lim, C. Nakawatase, L.A. Frohman; 1980. Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 : 846-852.
- Sinha Y.N., S.R. Baxter; 1979. Identification of a nonimmunoreactive but highly bioactive form of prolactin in the mouse pituitary by gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 325-330.
- Sinha Y.N., T.A. Gilligan; 1984. A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: Identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* 114: 2046-2053.
- Sinha Y.N., T.A. Gilligan, D.W. Lee; 1984. Detection of a high molecular weight variant of prolactin in human plasma by a combination of electrophoretic and immunologic techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58: 752-754.
- Sirinathsinghji D.J.S.; 1984. Modulation of lordosis behavior of female rats

- by naloxone, β -endorphin and its antiserum in the mesencephalic central gray: Possible mediation via GnRH. *Neuroendocrinology* 39: 222-230.
- Smith M.S.; 1980. Role of prolactin in regulating gonadotropin secretion and gonad function in female rats. *Federation Proc.* 39: 2571-2576.
- Sobel A., A.H. Tashjian Jr.; 1983. Distinct patterns of cytoplasmic protein phosphorylation related to regulation of synthesis and release of prolactin by GH cells. *J. Biol. Chem.* 258: 10312-10324.
- Södersten P., S. Hansen, P. Eneroth; 1983a. Evidence that prolactin does not affect the induction of sexual behaviour by oestradiol and progesterone in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.* 99: 181-187.
- Södersten P., S. Hansen, P. Eneroth; 1983b. Inhibition of sexual behaviour in lactating rats. *J. Endocrinol.* 99: 189-197.
- Soong Y.K., K.M. Ferguson, G. McGarrick, S.L. Jeffcoate; 1982. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hyperprolactinemic serum. *Clin. Endocrinology* 16: 259-265.
- Spitz I.M., B. Gonen, R. Luboshitzky, E. Rosen, O. Shemesh; 1979. The prolactin response to repeated intravenous stimuli. *Horm. Metab. Res.* 11: 319-320.
- Spitz I.M., B. Levitt, E. Zylber-Hasan, M. Haas, Y. Livshin; 1983. The dissociation of the exaggerated prolactin and thyrotropin responses in seminiferous tubule failure following the administration of a double-pulse of thyrotropin-releasing hormone. *J. Endocrinol. Invest.* 6: 273-276.
- Stegmayr B., K. Skogström; 1985. Hyperprolactinaemia and testosterone production. Observations in 2 men on long term dialysis. *Hormone Res.* 21: 224-228.
- Strickland T.W., J.G. Pierce; 1985. Glycosylation of ovine prolactin during cell-free biosynthesis. *Endocrinology* 116: 1295-1298.
- Suh H.K., A.G. Frantz; 1974. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 928-935.

- Szücs J., J. Makó, T. Györgyi, J. Foldes, T. Feher; 1984. Serum prolactin (PRL), testosterone(T), dehydroepiandrosterone (D) and dehydroepiandrosterone sulphate (D-s) in male uraemic patients on maintenance haemodialysis: Effect of bromocriptine. *Horm. Metabol. Res.* 16: 503-504.
- Tanaka T., R.P.C. Shiu, P.W. Gout, C.T. Beer, R.L. Noble, H.G. Friesen; 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: Measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 1058-1063.
- Topper Y.J., C.S. Freeman; 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60: 1049-1106.
- Tourniaire J., L. Bajard, J. Trouillas; 1982. Formes cliniques des hyperprolactinémies. Leur influence sur la fécondité humaine. En "Prolactine, neurotransmission et fertilité". Ed. par H. Clauser y J.P. Gautray. Masson and Cie Editeurs (Paris). pp. 217-229.
- Tresguerres J.A.F., A.I. Esquifino; 1981. Dissociation in the regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in a hyperprolactinaemic rat model: Interrelationships between gonadotropin and prolactin control. *J. Endocrinol.* 90: 41-51.
- Tresguerres J.A.F., Esquifino A.I., Perez Mendez L.F., Lopez-Calderon A.; 1981. Possible role of prolactin in the inhibitory effect of estradiol on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the rat. *Endocrinology* 108: 83-86.
- Tresguerres J.A.F., L.F. Perez Mendez, A. Lopez calderón, A.I. Esquifino; 1985. Possible role of prolactin in the inhibitory effect of testosterone on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the rat. *J. Endocrinol.* 105: 423-427.
- Turpen C., K.M. Knigge; 1979. In vitro release of prolactin by thyrotropin-releasing hormone: Influence of dopamine, thyroxine, and cycloheximide. *Hormone Res.* 11: 128-141.

- Vermes I., F.J.H. Tilders, J.C. Stoof; 1985. Dopamine inhibits the release of immunoreactive β -endorphin from rat hypothalamus in vitro. Brain Res. 326: 41-46.
- Viña J., I.R. Puertes, G.T. Saez, J.R. Viña; 1981. Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. FEBS Lett. 126: 250-252.
- Waeber C., O. Reymond, M. Reymond, T. Lemarchand-Beraud; 1983. Effects of hyper- and hypoprolactinemia on gonadotropin secretion, rat testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and testosterone production by isolated leydig cells. Biol. Reprod. 28: 167-177.
- Wahlström T., Huhtaniemi I., O. Horatta, M. Seppälä; 1983. Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptorassay. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57: 825-830.
- Wang C., V. Chang; 1982. Divergent effects of prolactin on estrogen and progesterone production by granulosa cells of rat graafian follicles. Endocrinology 110: 1085-1093.
- Wartofsky L., R.C. Dimond, G.L. Noel, A.G. Frantz, J.M. Earl; 1976. Effect of acute increases in serum triiodothyronine on TSH and prolactin responses to TRH, and estimates of pituitary stores of TSH and prolactin in normal subjects and in patients with primary hypothyroidism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 443-458.
- Weber R.F.A., M.P. Ooms, J.T.M. Vreeburg; 1982. Effects of a prolactin-secreting tumour on copulatory behavior in male rats. J. Endocrinol. 93: 223-229.
- Weisz-Carrington P., M.E. Roux, M. McWilliams, J.M. Phillips-Quagliata, M.E. Lamm; 1978. Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2928-2932.
- Weizman R., A. Weizman, J. Levi, V. Gura, D. Zevin, B. Maoz, H. Wijsenbeek.

- Hi. Ben David; 1983. Sexual dysfunction associated with hyperprolactinemia in males and females undergoing hemodialysis. *Psychosomatic Med.* 45: 259-269.
- Whitaker M.D., G.G. Klee, P.C. Kao, R.V. Randall, D.W. Heser; 1984. Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58: 826-830.
- Whittaker P.G., T. Wilcox, T. Lind; 1981. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big-big prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 863-866.
- Whitworth N.S., C.E. Grosvenor, F. Mena; 1981. Autofeedback regulation of prolactin (PRL) secretion: Effect of prolactin before suckling on the subsequent nursing-induced release of PRL in the lactating rat. *Endocrinology* 108: 1279-1284.
- Wong T.W., T.M. Jones; 1984. Hyperprolactinemia in male infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 35-39.
- Woolf P.D.; 1981. Resumption of prolactin secretion after dopaminergic inhibition: Differential effects of dopamine and its agonists. *Am. J. Physiol.* 240: E700-E704.
- Yamaji T., K. Shimamoto, M. Ishibashi, K. Kosaka, H. Orimo; 1976. Effect of age and sex on circulating and pituitary levels in human. *Acta Endocrin.* 83: 711-719.
- Ylikorkala O., S. Kivinen, L. Rönberg, L. Viinikka; 1980. Does bromocriptine block thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release during pregnancy?. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 600-602.
- Yoshiyama N., S. Nakagawa, J. Takeuchi, R. Okamoto; 1981. Uremic galactorrhea: An endocrine profile. *Nephron* 28: 227-233.
- Zacur H.A., W.E. Mitch, J.E. Tyson, P.T. Ostrow, G.V. Foster; 1982. Autoregulation of rat pituitary prolactin secretion demonstrated by a new perfusion method. *Am. J. Physiol.* 242: E226-E233.

- Zinder O., M. Hamosh, T.R. Clary-Fleck, R.O. Scow; 1974. Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary gland and adipose tissue of rats. *Am. J. Physiol.* 226: 744-748.
- Zumoff B., L. Walter, R.S. Rosenfeld, J.J. Strain, K. Degen, G.W. Strain, J. Levin, D. Fukushima; 1980. Subnormal plasma adrenal androgen levels in men with uremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 801-805.